



Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Innovation Pharmacologique

Présentée et soutenue par Rodolphe DUSAULCY
Le 7 novembre 2011

Titre : Les sécrétions du tissu adipeux :
rôles de l'autotaxine et recherche de nouvelles adipokines

JURY

Président : Pr Thierry LEVADE
Rapporteur : Dr Isabelle DUGAIL
Rapporteur : Dr Gérard LAMBEAU
Examineur : Dr Olivier PEYRUCHAUD
Directeur de thèse : Dr Jean Sébastien Saulnier-Blache

Ecole doctorale : Biologie Santé Biotechnologies
Unité de recherche : INSERM U1048 Equipe 3
Directeur(s) de Thèse : Dr Jean Sébastien Saulnier-Blache
Rapporteurs : Dr Isabelle DUGAIL et Dr Gérard LAMBEAU

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	4
Liste des abréviations.....	5
Liste des figures et tableaux	7
Fonction sécrétoire du tissu adipeux	8
Partie 1 : Autotaxine/LPA	14
I. Introduction.....	14
A. Le LPA lipide bioactif	14
1. Structure, différentes formes	14
2. Synthèse et dégradation du LPA	15
3. Récepteurs, signalisation	17
B. Autotaxine	22
1. Profil d'expression de l'autotaxine.....	23
2. Structure de l'autotaxine	24
3. Synthèse et sécrétion	26
4. Fonction enzymatique	27
5. Fonction non enzymatique	29
C. Pharmacologie du couple autotaxine/LPA	29
1. Les inhibiteurs de l'autotaxine	29
2. Les antagonistes des récepteurs au LPA	31
3. Les PA cycliques	32
D. Fonctions biologiques du couple autotaxine/LPA.....	33
1. Système cardiovasculaire	33
2. Inflammation et réponse immunitaire	34
3. Reproduction et développement.....	34
4. Cancer.....	35
5. Maladies neurologiques.....	37
6. Processus de cicatrisation et de réparation	37
7. Fibrose	37
E. Méthodes de dosage de l'activité enzymatique de l'autotaxine	39
F. Le couple autotaxine/LPA dans le tissu adipeux	40
1. Le LPA dans le tissu adipeux	40
2. L'autotaxine dans le tissu adipeux	40
3. Rôles du couple autotaxine/LPA dans le tissu adipeux.....	41
II. Objectifs de la première partie.....	42
III. Résultats : article 1.....	44

<i>IV. Discussion article 1</i>	<i>51</i>
<i>V. Résultats : article 2.....</i>	<i>53</i>
<i>VI. Discussion article 2</i>	<i>63</i>
<i>VII. Perspectives de la première partie.....</i>	<i>66</i>
Partie 2 : recherche de nouvelles adipokines	68
<i>I. Introduction.....</i>	<i>68</i>
A. Les études ciblées	68
B. Les études systématiques.....	69
1. Les recherches sur le transcriptome adipocytaire.....	69
2. Les recherches sur le sécrétome adipocytaire	70
C. Etudes fonctionnelles du sécrétome du tissu adipeux.....	72
1. Effets des sécrétions du tissu adipeux sur des hépatocytes	73
2. Effets des sécrétions du tissu adipeux sur des cellules musculaires.....	73
<i>II. Objectifs de la seconde partie</i>	<i>74</i>
<i>III. Matériel et méthode.....</i>	<i>75</i>
<i>IV. Résultats préliminaires.....</i>	<i>78</i>
<i>V. Discussion</i>	<i>85</i>
<i>VI. Perspectives de la seconde partie</i>	<i>85</i>
Conclusion générale	87
Annexes	88
<i>I. Poster</i>	<i>88</i>
<i>II. Curriculum Vitae.....</i>	<i>90</i>
Références	93

Résumé

Parallèlement à sa fonction de stockage, le tissu adipeux est aujourd'hui considéré comme un organe endocrine dont les sécrétions peuvent agir localement, de façon autocrine et paracrine, et/ou à distance sur de nombreux organes. Le sécrétome du tissu adipeux est composé de facteurs lipidiques, les lipokines, et protéiques, les adipokines. Ces facteurs ont des fonctions diverses dans l'organisme notamment sur le métabolisme énergétique, l'inflammation, ou encore la prolifération cellulaire et l'angiogénèse.

La première partie du manuscrit porte sur un médiateur lipidique, l'acide lysophosphatidique (LPA), et l'autotaxine (ATX), une lysophospholipase D sécrétée responsable de sa synthèse. L'expression de l'ATX est augmentée dans le tissu adipeux de sujets obèses et insulino-résistants. Le but de cette étude était de préciser le rôle *in vivo* de l'ATX adipocytaire au cours de l'obésité et ses conséquences sur les taux plasmatiques de LPA. Pour cela nous avons invalidé le gène codant pour l'ATX spécifiquement dans l'adipocyte chez des souris, à l'aide d'une approche transgénique de type Cre/lox. L'invalidation de l'ATX adipocytaire a entraîné une diminution de 38% du LPA plasmatique comparativement à des souris sauvages. Lorsque ces souris sont soumises à un régime obésogène enrichi en graisses, la masse de leur tissu adipeux augmente de façon plus importante comparativement aux souris sauvages. Ce phénotype est associé à une augmentation de l'expression du récepteur nucléaire PPAR γ et de certains de ses gènes cibles (ap2, adiponectine, leptine, Glut-1), ainsi qu'à une augmentation de la tolérance au glucose des souris. Ces résultats montrent que l'ATX adipocytaire contribue fortement aux taux plasmatiques de LPA et qu'elle constitue un frein à l'expansion du tissu adipeux en réponse à un régime gras.

La deuxième partie du manuscrit porte sur la recherche de nouvelles adipokines impliquées dans des perturbations du métabolisme glucidique et dans l'inflammation. Nous avons mis en évidence une augmentation d'expression des cytokines inflammatoires IL-6 et MCP1 par des myocytes de la lignée C2C12 traités par des milieux conditionnés (MC) d'explants de tissu adipeux. Nous tentons d'identifier le ou les facteurs responsables de ces effets par une approche de fractionnement de l'activité biologique des MC par isoélectrofocalisation, suivie d'une analyse en spectrométrie de masse.

Ce travail illustre les rôles importants joués par les sécrétions du tissu adipeux. Nous avons ainsi mis en évidence un exemple d'autorégulation de la masse adipeuse par l'ATX, et proposé une démarche permettant l'identification de nouveaux facteurs biologiquement actifs.

Abstract

In addition to its storage function, adipose tissue is now considered an endocrine organ whose secretions can act locally in an autocrine and paracrine manner, and / or on distant cells in many organs. The secretome of adipose tissue consists of lipid factors, the lipokines, and protein factors, the adipokines. These factors have various functions in the body including energy metabolism, inflammation, or cell proliferation and angiogenesis.

The first part of the manuscript deals with a lipid mediator, lysophosphatidic acid (LPA), and autotaxin (ATX), a secreted lysophospholipase D responsible for its synthesis. The expression of ATX is increased in adipose tissue of obese and insulin resistant individuals. The aim of this study was to clarify the role of adipocyte ATX in obesity *in vivo* and its impact on plasma levels of LPA. For this, we invalidated the ATX coding gene specifically in adipocytes, using a Cre / lox transgenic approach in mice. The invalidation of adipocyte ATX resulted in 38% reduction of plasma LPA compared with wild-type mice. When these mice are fed an obesogenic high fat diet their mass of adipose tissue increases to a greater extent when compared to wild-type mice. This phenotype is associated with an increased expression of nuclear receptor PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ) and some of its target genes (ap2, adiponectin, leptin, Glut-1), as well as with an improved glucose tolerance of the mice. These results show that adipocyte ATX contributes significantly to plasma levels of LPA and that it behaves as a negative regulator of adipose tissue expansion in response to a high fat diet.

The second part of the manuscript focuses on finding new adipokines involved in disturbances of glucose metabolism and inflammation. We have demonstrated an increased expression of the inflammatory cytokines IL-6 and MCP1 in the C2C12 myocytes cell line when they are exposed to adipose tissue conditioned media (MC). Ongoing experiments aim to identify the factors responsible for these effects by fractioning the bioactivity of MC using isoelectric focusing followed by mass spectrometry.

This work illustrates the important roles played by the secretion of adipose tissue. We have shown an example of self-regulation of body fat mass by autotaxin, and proposed an approach to identify new biologically active factors.

Liste des abréviations

ADNc : ADN complémentaire

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

apM1 : adipose most abundant gene transcript 1

ARNm : ARN messenger

ATX : autotaxine

C1q : complement component 1, q subcomponent

CB1R : récepteur aux cannabinoïdes de type 1

CHO : cellules ovariennes de hamster chinois

CTGF : connective tissue growth factor

CXCL1 : Chemokine, CXC Motif, Ligand 1

EDG : endothelial differentiation gene

ENPP2 : ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2

FATX-KO : souris invalidées pour le gène de l'autotaxine spécifiquement dans le tissu adipeux

FIZZ1 : found in inflammatory zone-1

FRET : fluorescence resonance energy transfer

GPAT : Glycérol 3-Phosphate Acyl Transférase

GPR87 : G protein-coupled receptor 87

GSK3 : glycogène synthase kinase

HCNP : hippocampal cholinergic neurostimulating protein

IL-1 β : interleukine-1 β

IL-6 : interleukine 6

IL-7 : interleukine 7

IL-8 : interleukine 8

IL-15 : interleukine 15

IMC : indice de masse corporelle

INHBB : inhibine beta B

IRS : insulin receptor substrate

JNK : c-Jun N-terminal kinases

LIPH : lipase H

LIPI : lipase I

LPA : acide lysophosphatidique

LPC : lysophosphatidylcholine
LPP : lipide phosphate phosphatase
lysoPLD : lysophospholipase D
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MCP1 : monocyte chemotactic protein 1
MORFO : modulator of oligodendrocyte remodeling and focal adhesion organization
NPP : nucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
NUC : nuclease-like
NUCB2 : nonesterified fatty acid/nucleobindin 2
PA : acide phosphatidique
PAI1 : plasminogen activator inhibitor 1
PDE : phosphodiesterase
PEDF : pigment epithelium-derived factor
PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase
PG : périgonadique
PGE2 : prostaglandine E2
PI3 Kinase : phosphatidylinositol 3-kinase
PLA : phospholipase A
PLB : phospholipase B
PLC : phospholipase C
PLD : phospholipase D
PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ
RBP4 : retinol-binding protein 4
RT-PCR : reverse transcription-réaction de polymérisations en chaîne
S1P : sphingosine 1-phosphate
SC : sous-cutané
SMB : somatomedin B-like
SVF : sérum de veau fœtal
TGF- β : transforming growth factor
TNF α : tumor necrosis factor α
VEGF : vascular endothelium growth factor
VH : véhicule utilisé pour la préparation des milieux conditionnés
 α -SMA : α -Smooth Muscle Actin

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : structure du LPA.....	14
Figure 2 : différentes voies de synthèse du LPA.....	16
Figure 3 : voies de signalisation couplées aux récepteurs LPA1 à 5	21
Figure 4 : différentes isoformes de l'autotaxine.....	23
Figure 5 : structure générale de l'autotaxine	24
Figure 6 : l'insulinémie n'est pas augmentée chez les souris invalidées pour le gène de l'ATX dans le tissu adipeux.....	66
Figure 7 : incorporation de glucose par des adipocytes traités par le véhicule ou par des milieux conditionnés de tissu adipeux humain.....	79
Figure 8 : expression génique de cytokines inflammatoires par des adipocytes traités par des milieux conditionnés de tissu adipeux.....	79
Figure 9 : expression génique de cytokines inflammatoires par des myocytes traités par le véhicule ou par des milieux conditionnés de tissu adipeux.....	80
Figure 10 : stratégie d'isolement et d'identification de facteurs actifs	81
Figure 11 : expression génique de cytokines inflammatoires par des myocytes traités par des fractions de différents milieux conditionnés de tissu adipeux humain	83
Figure 12 : comparaison de l'induction de l'expression génique de cytokines inflammatoires par les différentes fractions sélectionnées	84
 Tableau 1 : principales lipokines.....	 9
Tableau 2 : principales adipokines	10
Tableau 3 : séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour les mesures d'expression génique par RT-qPCR.....	78
Tableau 4 : fractions de milieux conditionnés de tissu adipeux humain sélectionnées pour leur activité biologique	84

Fonction sécrétoire du tissu adipeux

Le tissu adipeux blanc est un tissu complexe doté d'une grande plasticité. Il est constitué d'adipocytes, et des cellules de la fraction stroma-vasculaire qui inclut des préadipocytes, des cellules endothéliales, des macrophages, des mastocytes, des cellules dendritiques ainsi que des terminaisons nerveuses [1]. Le poids du tissu adipeux blanc évolue afin de s'adapter au statut énergétique de l'organisme. Dans les situations où les apports énergétiques de l'organisme dépassent ses dépenses, la masse de tissu adipeux augmente grâce aux phénomènes d'hyperplasie (augmentation du nombre) et d'hypertrophie (augmentation de la taille) adipocytaires. Ceci s'accompagne d'un remodelage profond du tissu adipeux, de sa vascularisation, de sa matrice extra-cellulaire, lui permettant de stocker l'excès énergétique sous forme de triglycéride dans la vacuole lipidique des adipocytes. Un développement excessif de ce tissu peut aboutir à l'obésité qui se caractérise par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg/m^2 . Inversement dans les situations telles que le jeûne, où la balance énergétique est négative, la masse de tissu adipeux diminue afin de libérer les substrats énergétiques permettant de couvrir les besoins de l'organisme.

Aujourd'hui, l'étude du tissu adipeux ne peut se réduire à cette seule fonction de stockage, et de développement. La découverte de la leptine, en 1994 par Zhang et ses collaborateurs [2] a révélé la fonction sécrétoire du tissu adipeux. L'émergence du concept de « tissu adipeux endocrine » constitue certainement un des éléments les plus importants dans le domaine de la recherche sur le métabolisme et l'obésité de ces deux dernières décennies. Notre vision du tissu adipeux a ainsi fondamentalement changé. Ce tissu n'est aujourd'hui plus considéré comme un simple tissu de stockage des lipides, mais comme un organe actif dont la fonction sécrétoire est capable d'agir sur les organes centraux et périphériques et sur la physiologie de l'organisme.

Le nombre croissant de facteurs sécrétés par le tissu adipeux décrits dans la littérature est le témoin de ce rôle endocrine jusque là sous estimé du tissu adipeux [3]. L'ensemble des sécrétions du tissu adipeux peut être regroupé sous le terme « sécrétome ». Ce sécrétome adipeux est d'une grande complexité tant par la diversité des facteurs qui le constituent que par les différentes cellules le produisant. La majorité de ces molécules est sécrétée par les adipocytes mais aussi par les macrophages du tissu adipeux, ce qui peut expliquer que de nombreux facteurs exercent un effet proinflammatoire responsable, au moins en partie, de l'inflammation de bas niveau du tissu adipeux décrite chez l'obèse [3, 4].

- **Lipokines**

Parmi les molécules sécrétées par le tissu adipeux il existe de nombreux lipides. Le tissu adipeux de par sa fonction de stockage contient la majorité des acides gras et du cholestérol libre non estérifié dans l'organisme. La mobilisation des substrats énergétiques du tissu adipeux, les triglycérides, par le processus de lipolyse permet la libération d'acides gras, principalement du palmitate et de l'oléate [1]. Cependant le tissu adipeux est aussi capable de produire et de sécréter des lipides bioactifs permettant une communication intercellulaire (Tableau 1). Le terme « lipokine », permettant de regrouper ces molécules, est apparu en 2008 dans la littérature lors de la mise en évidence de la sécrétion et des effets du C16:1n7palmitoleate [5]. Cependant le C16:1n7palmitoleate n'est pas le seul lipide bioactif libéré par le tissu adipeux. La sécrétion par les adipocytes d'acide lysophosphatidique (LPA), dont nous reparlerons plus amplement par la suite, a été décrite dès 1998 [6]. Certaines prostaglandines et des endocannabinoïdes, dont PGE2 [7] et l'anandamide [8] sont encore d'autres exemples de lipokines. Les effets de ces facteurs lipidiques ont été décrits dans plusieurs domaines, tels que l'inflammation, et le métabolisme énergétique.

<i>Lipokine</i>	<i>Métabolisme et système cardiovasculaire</i>	<i>Inflammation chronique ou réponse inflammatoire aigue</i>	<i>Pro-mitotiques ou pro-angiogéniques</i>
C16:1n7palmitoleate	+		
acide lysophosphatidique	+	+	+
prostaglandine E2 (PGE2)	+	+	
anandamide	+		

Tableau 1 : principales lipokines

<i>Adipokine</i>	<i>Métabolisme et système cardiovasculaire</i>	<i>Inflammation chronique ou réponse inflammatoire aigue</i>	<i>Composants de la matrice extra-cellulaire</i>	<i>Pro-mitotiques ou pro-angiogéniques</i>
Adipocyte fatty acid binding protein 4 (aP2)	+			
Adiponectine	+	(anti-inflammatoire)		
Adipsine	+	+		
Apeline	+	+		+
Apolipoprotéine E	+	+		
Inhibine beta B (INHBB)	+			
Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	+			+
Leptine	+			+
Lipoprotéine lipase (LPL)	+			
Omentine	+	(anti-inflammatoire)		
Pigment epithelium-derived factor » (PEDF)	+	+		(anti-angiogénique)
Résistine	+	+		
Retinol-binding protein 4 (RBP4)	+			
Secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5)	+	(anti-inflammatoire)		
Visfatine	+	+		
Alpha 1 acid glycoprotein		(anti-inflammatoire)		
Interleukine 1 β (IL-1 β)		+		
Interleukine 4 (IL-4) *		+		
Interleukine 6 (IL-6)		+		
Interleukine 8 (IL-8)		+		
Interleukine 10 (IL-10)		(anti-inflammatoire)		
Interleukine 18 (IL-18)		+		
Macrophage migration inhibitor factor (MIF)		+		
Monocyte chemotactic protein 1 (MCP1)		+		
Serum amyloid A3		+		
Tumor necrosis factor α (TNF α)		+		
Collagène de type I *			+	
Collagène de type III *			+	
Collagène de type IV *			+	
Collagène de type VI *			+	
Fibronectine *			+	
Gelsoline *			+	
Lysyl Oxidase *			+	
Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) *			+	
Matrix metalloproteinase 7 (MMP7) *			+	
Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) *			+	
Matrix metalloproteinase 10 (MMP10) *			+	
Matrix metalloproteinase 11 (MMP11) *			+	
Matrix metalloproteinase 14 (MMP14) *			+	
Matrix metalloproteinase 15 (MMP15) *			+	
Angiopoïétine 1 *				+
Angiopoïétine 2 *				+

Tableau 2 : principales adipokines

(* protéine sécrétée exprimée par le tissu adipeux mais dont la sécrétion comme facteur soluble est incertaine)

• Adipokines

Les facteurs protéiques sécrétés par le tissu adipeux sont regroupés sous le terme « adipokine » qui a remplacé l'appellation « adipocytokine » suggérant à tort que ces facteurs sont nécessairement des cytokines, c'est-à-dire des facteurs agissant sur le système immunitaire [1] (Tableau 2). Cependant la confusion reste présente concernant les facteurs

inclus dans le groupe des adipokines. Faut-il considérer que seules les protéines sécrétées par les adipocytes eux-mêmes sont les vraies adipokines ou faut-il inclure sous ce terme les facteurs sécrétés par le tissu adipeux et donc par tous les types cellulaires le composant ? Trayhurn et al. définissent les adipokines comme « toute protéine sécrétée par les adipocytes blancs » [1]. Cette définition exclut donc les facteurs produits par les autres types cellulaires de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux dont les macrophages. Cette interprétation repose sur l'idée qu'il est illogique d'appeler une protéine « adipokine » lorsqu'elle est sécrétée par un macrophage dans le tissu adipeux et « cytokine » lorsqu'elle est sécrétée par la même cellule lorsqu'elle est hors du tissu adipeux [1]. Nous préférons ici inclure tous les facteurs produits par l'ensemble des types cellulaires du tissu adipeux considérant que l'expression et la sécrétion de ces facteurs dépend de l'état physiologique du tissu et qu'un macrophage du tissu adipeux n'est pas la même cellule qu'un macrophage circulant [9].

- **Contrôle de la fonction endocrine du tissu adipeux**

Dans l'organisme, la fonction endocrine est un système de communication intercellulaire hautement régulé, sous le contrôle du système hypothalamo-hypophysaire ou de paramètres physiologiques et de mécanismes de rétrocontrôle. Considérer le tissu adipeux comme un organe endocrine requiert l'existence de régulations de sa fonction sécrétoire. Une fonction sécrétoire non régulée assurant une imprégnation basale et constante de l'organisme ne constitue pas un système endocrine.

Les modifications de l'expression et de la sécrétion de chaque adipokine sont le résultat de programmes de transcription contrôlant des groupes de gènes adipocytaires et de mécanismes post-traductionnels contrôlant spécifiquement la sécrétion des facteurs [3]. Les paramètres qui semblent le plus influencer le profil d'expression des adipokines concernent l'adiposité, c'est-à-dire la masse grasse, la proportion de tissu gras, et la distribution du tissu adipeux dans l'organisme [3]. L'expression de la plupart des adipokines, hormis quelques exceptions telles que l'adipsine ou l'adiponectine, est positivement corrélée à la masse grasse [3]. Des dérégulations des adipokines sont décrites tant dans des situations d'excès de masse grasse (augmentation de la leptine, de l'IL-6, de l'IL-8, de MCP1, de la résistine, de RBP4, de PAI1, du TNF α et diminution de l'adiponectine) que dans des situations de lipotrophie caractérisées par un manque de tissu adipeux (diminution de la leptine et de l'adiponectine) [10, 11].

Il peut aussi exister des mécanismes de rétrocontrôle entre le tissu adipeux et les tissus ciblés par ces sécrétions. Ainsi, les sécrétions du tissu adipeux sont capables d'agir au niveau du système nerveux central qui possède lui-même certaines terminaisons sympathiques

contrôlant la masse adipeuse [12]. Il semble aussi que le pancréas puisse lui aussi être impliqué dans un mécanisme de rétrocontrôle. L'insuline sécrétée par les cellules β stimule au niveau du tissu adipeux la sécrétion d'apeline qui à son tour est capable d'inhiber la sécrétion d'insuline [13, 14]. Le muscle, qui est lui aussi une cible des adipokines et lipokines, sécrète des facteurs appelés myokines, telles que la myostatine, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-8 et l'IL15, susceptibles d'entraîner un rétrocontrôle sur le tissu adipeux. Il pourrait notamment s'agir d'un rétrocontrôle positif, notamment grâce à l'IL-6 capable d'amplifier l'état d'inflammation de bas niveau observé chez l'obèse [1].

- **Fonctions et utilisation thérapeutique des sécrétions du tissu adipeux**

Les facteurs produits par les adipocytes peuvent être regroupés en quatre grandes classes selon leur fonction : les facteurs influençant directement le métabolisme, les facteurs proinflammatoires ou entraînant une réponse aigüe, les composants de la matrice extracellulaire, et les facteurs promitotiques ou proangiogéniques [3] (Tableau 1 et Tableau 2).

Les effets biologiques des adipokines en font des cibles pharmacologiques potentielles dans le traitement de nombreuses pathologies. Cependant, la découverte récente de la plupart de ces facteurs ainsi que leurs effets multiples et complexes limitent encore les applications concrètes [3]. Peu d'études cliniques utilisant des adipokines dans un but thérapeutique sont à ce jour publiées. La plupart concernent la leptine. Par exemple, en combinaison avec un traitement par l'amyline, la leptine améliore la perte de poids chez des individus obèses ou en surpoids [15]. Une étude montre aussi que la leptine exerce des effets bénéfiques chez les diabétiques de type 1, tels qu'une normalisation de l'hémoglobine 1Ac [16].

- **Le tissu adipeux, un organe endocrine comme les autres ?**

Il faut demeurer prudent sur la notion d'organe endocrine. Le tissu adipeux n'est pas une glande individualisée déversant directement ses sécrétions dans la circulation sanguine. Certaines molécules, telles que le TNF α par exemple, sécrétées par les cellules du tissu adipeux jouent un rôle autocrine ou paracrine sans toutefois modifier les concentrations plasmatiques [17, 18]. Une particularité du tissu adipeux est son organisation en différents dépôts. L'étude de ces dépôts adipeux a permis de faire émerger des différences, notamment entre les dépôts profonds et les dépôts sous-cutanés. Il semble par exemple que la quantité de leptine sécrétée par le tissu adipeux périgonadique soit jusqu'à dix fois supérieure à celle sécrétée par le tissu adipeux sous-cutané chez le rat [19]. La localisation elle-même de ces différents dépôts est cruciale, elle détermine les premiers organes placés sous l'action locale du tissu adipeux. Ainsi, le foie est le premier organe à recevoir les sécrétions du tissu adipeux

viscéral, le cœur est sous l'influence du tissu adipeux épicardique, et certains muscles sont au contact de certains dépôts adipeux sous-cutanés ou d'adipocytes intramusculaires. Ces organes bénéficient des substrats énergétiques libérés par le tissu adipeux, mais aussi des lipokines et adipokines sécrétées localement [20]. Le tissu adipeux ne devrait donc pas être considéré comme un, mais des organes endocrines.

Partie 1 : Autotaxine/LPA

I. Introduction

A. Le LPA lipide bioactif

Le LPA est un médiateur lipidique retrouvé au niveau intracellulaire et extracellulaire capable de réguler de nombreuses fonctions cellulaires et associé à l'étiologie d'un nombre croissant de pathologies. L'imperméabilité de la membrane plasmique au LPA implique des processus de synthèse et de signalisation spécifiques de part et d'autre.

1. Structure, différentes formes

Le LPA est un phospholipide contenant une mole d'acide gras par mole. Il est constitué d'un squelette glycérophosphate auquel est lié un acide gras le plus souvent à longue chaîne. Cette liaison de l'acide gras peut se faire sur les atomes de carbone 1 ou 2 du glycérol (Figure 1). Différentes formes de LPA sont retrouvées *in vivo*. Ces formes dépendent de la nature de l'acide gras, saturé (16:0 ; 18:0) ou insaturé (16:1 ; 18:1 ; 18:2 ; 20:4), de sa position sur le glycérol et du type de liaison (acyl ou alkyl) [21]. Il semble que les formes saturées soient majoritairement liées en position 1 et les formes insaturées majoritairement en position 2 du glycérol [22].

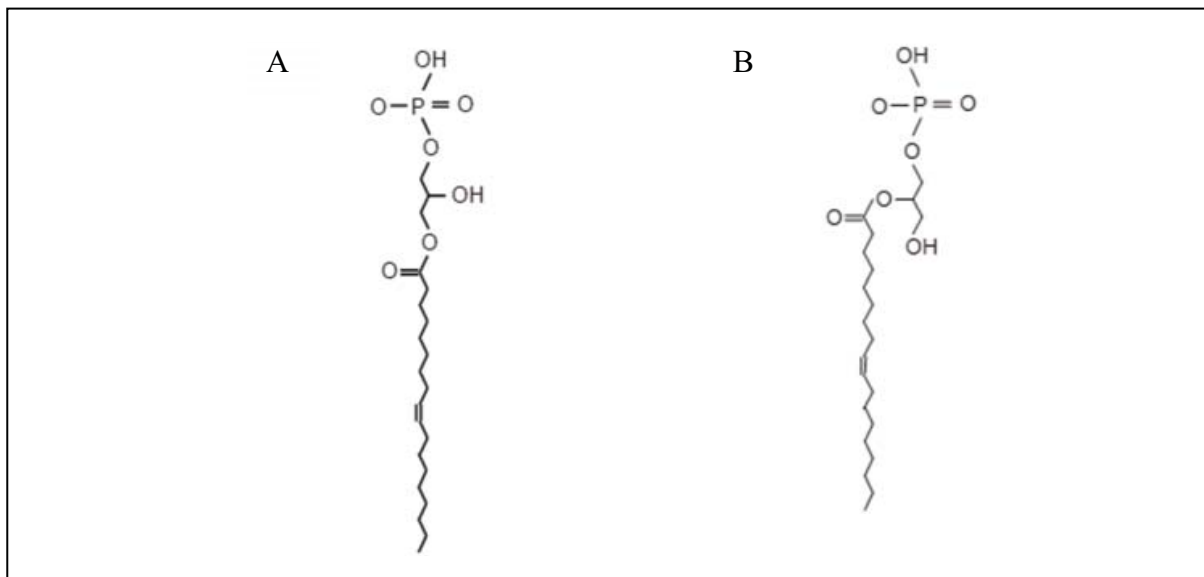


Figure 1 : structure du LPA

Oleoyl-LPA (A) Acide gras lié en position 1 ; (B) Acide gras lié en position 2

2. Synthèse et dégradation du LPA

Le LPA est retrouvé en solution dans de nombreux fluides biologiques. Des études ont décrit sa présence au niveau sanguin dans le sérum, le plasma, mais aussi dans la salive, le liquide folliculaire, le milieu interstitiel du tissu adipeux, l'humeur aqueuse, et le liquide lacrymal [23, 24]. Il peut être produit au niveau intracellulaire et extracellulaire mais il ne semble pas exister d'échange entre ces deux compartiments car le LPA ne peut pas diffuser librement à travers la membrane plasmique en raison de sa nature polaire. Il existe pour certains facteurs lipidiques des transporteurs membranaires, mais à ce jour aucun transporteur du LPA n'a été décrit [25].

- **Synthèse intracellulaire**

La production de LPA intracellulaire peut servir d'intermédiaire dans la synthèse des phospholipides et des triglycérides. Cette synthèse se fait par l'action d'une acyltransférase, la GPAT (Glycérol 3-Phosphate Acyl Transférase), sur du glycérol-3-phosphate [23] (Figure 2).

- **Synthèse extracellulaire**

Au niveau extracellulaire, il existe principalement deux voies de production du LPA chacune pouvant être décomposée en deux étapes (Figure 2).

Le LPA peut être produit à partir de diacylglycérol ou de phospholipides qui sont convertis en acide phosphatidique (PA) par, respectivement, une diacylglycérol kinase ou une phospholipase D (PLD). Le PA ainsi produit est ensuite hydrolysé par une phospholipase A₂ (PLA₂) sécrétée [26] ou par une phospholipase A₁ (PLA₁) sélective du PA (PA-PLA₁ α /LIPH ; PA-PLA₁ β /LIPI) [27, 28]. Cette dernière réaction aboutit à la formation d'un acide gras et d'une molécule de LPA. Elle a longtemps été décrite comme spécifique des plaquettes et des cellules cancéreuses [29] mais il semblerait qu'elle soit aussi impliquée dans d'autres processus physiologiques comme la croissance capillaire [30].

Dans l'autre voie de synthèse principale, les phospholipides, majoritairement la phosphatidylcholine, sont d'abord convertis en lysophospholipides par l'action d'une PLA₁ ou d'une PLA₂ (PLA₂ sécrétées, PS-PLA₁, Lécitine Cholestérol AcylTransférase), puis ces lysophospholipides sont transformés en LPA par une lysoPLD, l'ATX. Cette voie impliquant l'ATX se déroule majoritairement dans les liquides biologiques tels que le sérum ou le plasma [23] (un chapitre sera consacré à l'étude de l'ATX).

Une troisième voie de synthèse extracellulaire a récemment été décrite. Elle consiste en une phosphorylation de monoacylglycérol par une monoacylglycérol kinase [31].

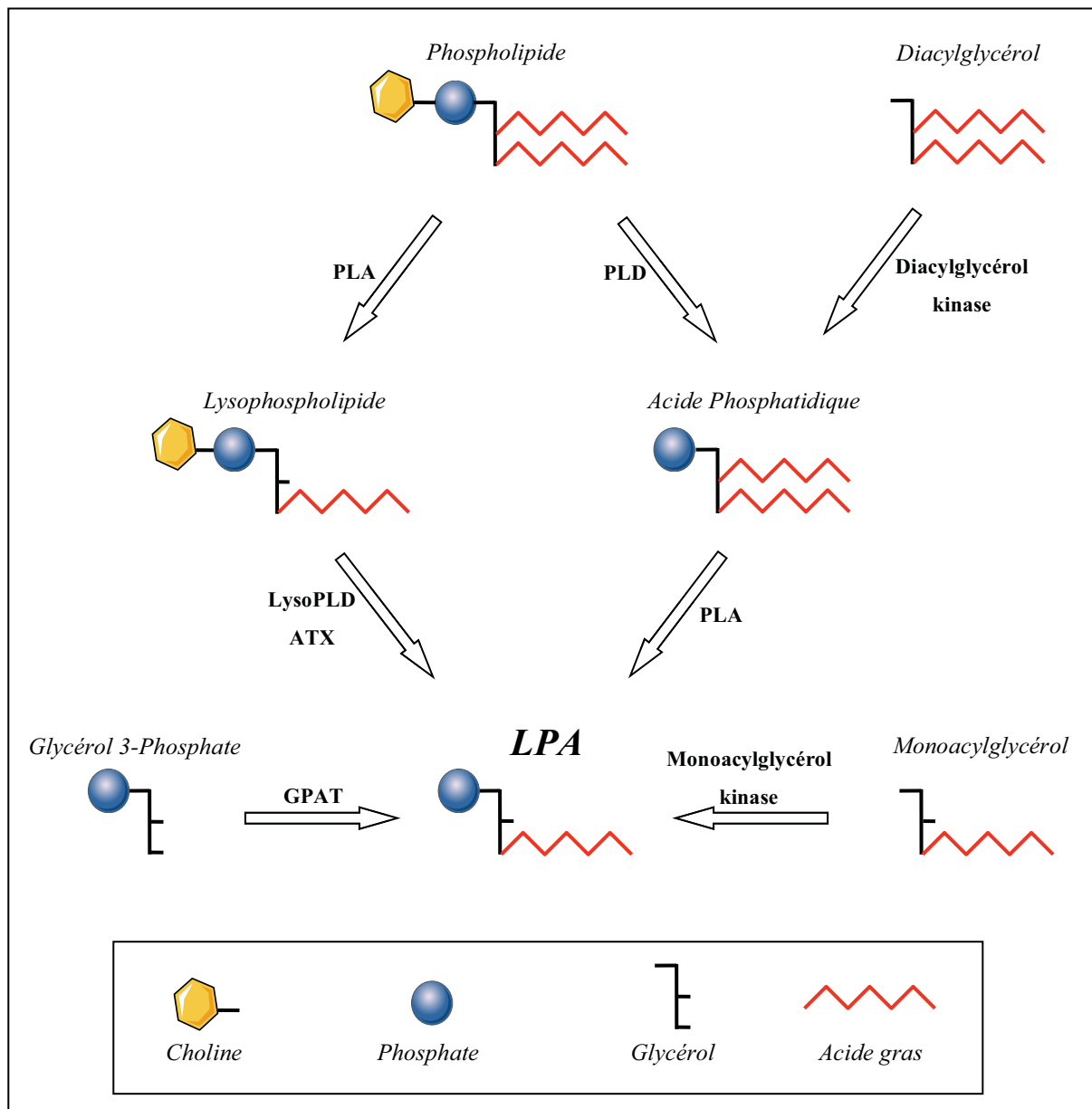


Figure 2 : différentes voies de synthèse du LPA

Au niveau intracellulaire, le LPA peut être synthétisé par l'action de la GPAT (Glycérol 3-Phosphate Acyl Transférase) sur du glycérol 3-phosphate. Au niveau extracellulaire, il existe trois voies de synthèse. Un phospholipide ou un diacylglycérol peuvent être convertis en PA (Acide Phosphatidique) par une PLD (Phospholipase D) ou une diacylglycérol kinase, puis de PA est converti en LPA par une PLA (Phospholipase A). Un phospholipide peut être transformé en lysophospholipide par une PLA, puis en LPA par l'ATX. Enfin, une monoacylglycérol kinase peut phosphoryler un monoacylglycérol en LPA.

• Dégradation du LPA

La demi-vie du LPA est d'environ 3 minutes chez la souris [32, 33]. Cette demi-vie courte s'explique par l'existence de mécanismes de dégradation. Ces mécanismes de dégradation du LPA sont encore aujourd'hui moins connus que l'ensemble des mécanismes de production du LPA. Nous pouvons notamment nous interroger sur leur possible implication dans des processus physiopathologiques.

Au niveau intracellulaire, le LPA peut être transformé en PA par une acylglycerol-3-phosphate acyltransferase (AGPAT) [25] ou dégradé en phosphatidyl-glycérol par une lysophospholipase [34].

Tout comme la sphingosine 1-phosphate (S1P), le LPA extracellulaire est sensible à l'action de lipide phosphate phosphatases (LPP) qui le déphosphorylent, formant ainsi un monoacylglycérol. Chez les mammifères il existe trois LPP notées LPP₁ à LPP₃ et un variant d'épissage noté LPP_{1a} [35]. LPP₁ et LPP₃ sont les formes majoritaires [33]. Les LPP sont des protéines à 6 domaines transmembranaires dont le site catalytique est orienté sur la face extracellulaire de la membrane plasmique, ou à l'intérieur de vésicules intracellulaires [36]. La LPP₁ semble fortement impliquée dans la régulation des taux de LPA puisque chez des souris invalidées pour le gène de la LPP₁, la demi-vie du LPA est multipliée par quatre pour atteindre 12 minutes, entraînant une augmentation du taux de LPA plasmatique [33]. De plus en dégradant le PA en diacylglycérol les LPP peuvent diminuer la disponibilité de cet intermédiaire dans la synthèse du LPA, jouant ainsi un rôle supplémentaire dans le contrôle des taux de LPA [36].

Une diminution des mécanismes de dégradation du LPA pourrait être impliquée dans certains cancers puisqu'il a été montré que l'activité LPP est basse dans de nombreux types de cellules cancéreuses, ce qui pourrait augmenter localement la quantité de LPA [36]. D'autre part, les LPP sont des protéines membranaires, pouvant être localisées au niveau de la membrane plasmique ou dans des vésicules intracellulaires. Il est possible que leur action sur l'activité du LPA dépende d'une part de leur expression mais aussi de leur localisation dans des vésicules ou au niveau de la membrane plasmique à proximité des récepteurs au LPA ou des enzymes de synthèse du LPA.

3. Récepteurs, signalisation

Dans le sérum, le LPA est lié à l'albumine ou à d'autres protéines sanguines telles que la gelsoline [37]. Cette dernière pourrait jouer un rôle régulateur de l'activité du LPA selon sa concentration et être impliquée dans certaines pathologies [38, 39]. La plupart des actions du LPA est due à l'activation de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G, mais il a aussi été montré que le LPA peut activer le récepteur nucléaire PPAR γ [40].

- **Différents types de récepteurs**

A ce jour, cinq récepteurs à sept domaines transmembranaires, notés LPA1 à LPA5, sont clairement identifiés comme des récepteurs au LPA. Ces récepteurs au LPA peuvent être

classés en deux groupes selon leur structure primaire. Les trois premiers, nommés LPA1 (EDG2), LPA2 (EDG4) et LPA3 (EDG7), appartiennent à la famille de récepteurs EDG (endothelial differentiation genes). Il y a une homologie de séquence en acide aminés de 50% à 60% entre ces trois premiers récepteurs au LPA. Les récepteurs LPA4 et LPA5 possèdent 35% d'homologie entre eux, ils appartiennent à la famille des récepteurs purinergiques [41].

Trois récepteurs supplémentaires, faisant eux aussi partie de la famille des récepteurs purinergiques, ont été récemment proposés comme possibles récepteurs au LPA. Ce sont les récepteurs GPR87, P2Y5 et P2Y10 [42-45]. Parmi ces trois récepteurs le mieux décrit à l'heure actuelle est le récepteur P2Y5 (LPA6) impliqué dans la croissance capillaire. Deux études montrent qu'une mutation récessive du gène codant pour ce récepteur entraînerait une perte de cheveux [43, 44]. L'affinité de ce récepteur pour le LPA est très faible par rapport aux récepteurs LPA1 à 5. Cette observation rend incertaine l'hypothèse selon laquelle le LPA est le ligand physiologique de ce récepteur [41]. Cependant, un couplage direct entre la synthèse du LPA et l'activation du récepteur pourrait permettre à ce récepteur de jouer un rôle dans la signalisation du LPA. La PA-PLA₁ α /LIPH qui permet d'hydrolyse du PA en LPA est exprimée de façon identique au récepteur P2Y5 au sein du follicule pileux. Une production locale de LPA dans le follicule pileux pourrait générer localement de fortes concentrations en LPA au niveau du récepteur et permettre son activation physiologique malgré sa faible affinité [43, 44]. Le récepteur P2Y10 possède lui la particularité d'être coactivable par deux phospholipides, le LPA et la sphingosine-1-P [42]. Le LPA est le premier ligand connu du récepteur GPR87. Sa liaison à ce récepteur permet une libération de Ca²⁺ intracellulaire [45]. Cependant aucune étude n'associe encore de fonction à cette activation du récepteur GPR87 par le LPA.

- **Profil d'expression des différents récepteurs**

Le récepteur LPA1 est le plus largement exprimé. Il est retrouvé dès le développement embryonnaire chez la souris, principalement dans le cerveau. A l'âge adulte il a été décrit dans la plupart des organes hormis le foie. Il est aussi exprimé dans presque tous les tissus humains [41].

L'expression du récepteur LPA2 est plus restreinte que celle du récepteur LPA1. Chez la souris il est fortement exprimé dans les reins, l'utérus, les testicules, et plus faiblement dans les poumons, l'estomac, la rate, le thymus, le cerveau et le cœur. Tout comme le récepteur LPA1 il est présent dans le cerveau au cours du développement embryonnaire, mais son expression y diminue après la naissance. Chez l'homme, l'expression du récepteur LPA2 est

très localisée. Elle est forte dans les testicules et les leucocytes, et modérée dans la prostate, la rate, le thymus, et le pancréas [41].

Le récepteur LPA3 a une expression assez large chez la souris (testicules, reins, poumons, intestin grêle, cœur, estomac, rate, cerveau, thymus, utérus au moment de l'implantation) alors qu'elle est plus spécifique de certains organes chez l'homme (cœur, gonades, prostate, pancréas, poumons, cerveau) [41].

Le récepteur LPA4 est peu exprimé chez la souris, on le retrouve principalement dans les ovaires faiblement dans le cœur, la peau, le thymus, et au cours du développement embryonnaire dans le cerveau et les fibroblastes. Chez l'homme, il est abondamment exprimé dans les ovaires [41].

Le récepteur LPA5 est exprimé dans de nombreux tissus murins : l'intestin grêle, la peau, la rate, l'estomac, le thymus, les poumons, le cœur, et dans le cerveau lors du développement embryonnaire. Chez l'homme, la rate est le principal site d'expression [41].

L'expression de P2Y5 (LPA6) semble spécifique du follicule pileux [37].

- **Invalidation des récepteurs chez la souris**

Les premières souris invalidées pour le récepteur LPA1 ont été générées en 2000 par invalidation de l'exon 3 qui contient les domaines transmembranaires I à VI. La mortalité périnatale touche 50% des souris, les autres expriment un phénotype anormal. Elles sont de petite taille et ont un museau court, les yeux écartés et un cerveau de taille réduite. Le phénotype de ces souris atteint aussi le comportement des nouveaux nés chez qui la succion est réduite en raison de probables troubles de l'olfaction [46]. A l'âge adulte, elles présentent une plus forte adiposité que des souris sauvages. Ceci serait dû à une perte de l'effet anti-adipogénique du LPA sur les préadipocytes [47]. Au niveau du système nerveux, la délétion du récepteur LPA1 entraîne une faible augmentation de l'apoptose des cellules de Schwann sans entraîner de perturbations des mouvements [46]. La prolifération des astrocytes dérivés de ces souris en réponse au LPA est réduite [48]. Par ailleurs, le phénotype comprend une perception de la douleur réduite [49] et une résistance aux lésions et à la fibrose induites au niveau rénal par une obstruction urétérale unilatérale [50] et au niveau pulmonaire par la bléomycine [51].

L'invalidation chez la souris du récepteur LPA2 a été réalisée en 2002 par délétion de l'exon 2 qui code pour les domaines transmembranaires I à VI. La perte de ce récepteur n'entraîne pas de phénotype apparent *in vivo* chez les nouveaux nés et chez l'adulte [52].

Des souris doublement invalidées pour les récepteurs LPA1 et LPA2 ont été générées en croisant les deux lignées. Cette double mutation est responsable d'un phénotype global

identique à celui des souris invalidées pour le récepteur LPA1. Ce qui suggère un rôle mineur du récepteur LPA2 comparativement au récepteur LPA1. Cependant certaines réponses cellulaires au LPA telles que la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, la prolifération, l'activation de certaines voies de signalisation et la formation de fibres de stress, sont sévèrement réduites voire absentes dans des fibroblastes issus de ces souris alors qu'elles ne sont que faiblement affectées dans ceux issus des simples mutants. Ceci démontre que bien qu'il ne soit pas un récepteur essentiel, le LPA2 joue un rôle redondant avec le récepteur LPA1 dans la signalisation de certaines réponses au LPA dans les fibroblastes [52]. De plus, *ex vivo*, la stimulation de la prolifération de progéniteurs neuronaux permettant l'épaississement du cortex cérébral est abolie dans les embryons sans récepteurs LPA1 et LPA2 [53].

En 2005 des travaux ont porté sur des souris invalidées pour le récepteur LPA3 par perte du premier codon de l'exon 2. L'effet de cette invalidation apparaît lors de la gestation des femelles mutées chez lesquelles l'implantation des embryons est anormale et retardée, conduisant à la formation de placentas hypertrophiques et à un retard de développement voire à la mort des embryons. Le retard d'implantation est dû à une diminution de l'expression de la cyclooxygénase 2 entraînant une diminution des taux de prostaglandines E2 et I2 essentielles à l'implantation [54].

Chez les souris invalidées pour le récepteur LPA4, obtenues en 2008, une forte mortalité est observée durant le développement embryonnaire. La majorité des embryons semble mourir en fin de gestation en raison de défauts de vascularisation entraînant des hémorragies et des œdèmes au niveau de différents organes [55]. Ce phénotype est proche de celui des souris invalidées pour l'ATX qui se caractérise par des défauts de vascularisation de l'embryon et du sac vitellin conduisant à la mort de l'embryon [56, 57]. Ceci suggère que le récepteur LPA4 est impliqué dans les principaux effets de l'ATX durant l'embryogénèse. Les souris invalidées pour le récepteur LPA4 qui ne meurent pas *in utero* n'expriment pas de phénotype anormal à l'âge adulte hormis une ostéogénèse augmentée [58]. Les fibroblastes issus de ces souris sont hypersensibles à la stimulation de la migration par le LPA. Ceci s'accompagne d'une plus forte stimulation d'Akt et de Rac et d'une diminution de la stimulation de Rho [59].

- **Signalisation**

De manière générale, les récepteurs au LPA sont couplés aux protéines G hétérotrimériques $\text{G}\alpha_{i/o}$, $\text{G}\alpha_{q/11}$, $\text{G}\alpha_{12/13}$ et $\text{G}\alpha_s$ contrôlant plusieurs voies de signalisation.

Les récepteurs LPA1 et LPA2, stimulant la prolifération et la survie cellulaire, sont principalement couplés à $G_{\alpha i/o}$ qui diminue l'AMPc intracellulaire et active les voies des MAP Kinases, et de la PI3 Kinase. Ils sont aussi couplés à $G_{\alpha 12/13}$, par laquelle ils activent la petite GTPase Rho impliquée dans la migration cellulaire. L'activation des récepteurs LPA2, LPA3 et LPA4 couplés à $G_{\alpha q/11}$ mobilise le Ca^{2+} intracellulaire via l'activation de la phospholipase C (PLC). Cependant, la signalisation du récepteur LPA4 se distingue car ce récepteur est le seul à être couplé à une protéine $G_{\alpha s}$, et sa stimulation induit une accumulation d'AMPc intracellulaire. Enfin le récepteur LPA5 engendre la formation de fibres de stress grâce à son couplage à une protéine $G_{\alpha 12/13}$ et à la voie de Rho [23, 41].

Pour une description plus exhaustive des voies de signalisation voir la Figure 3.

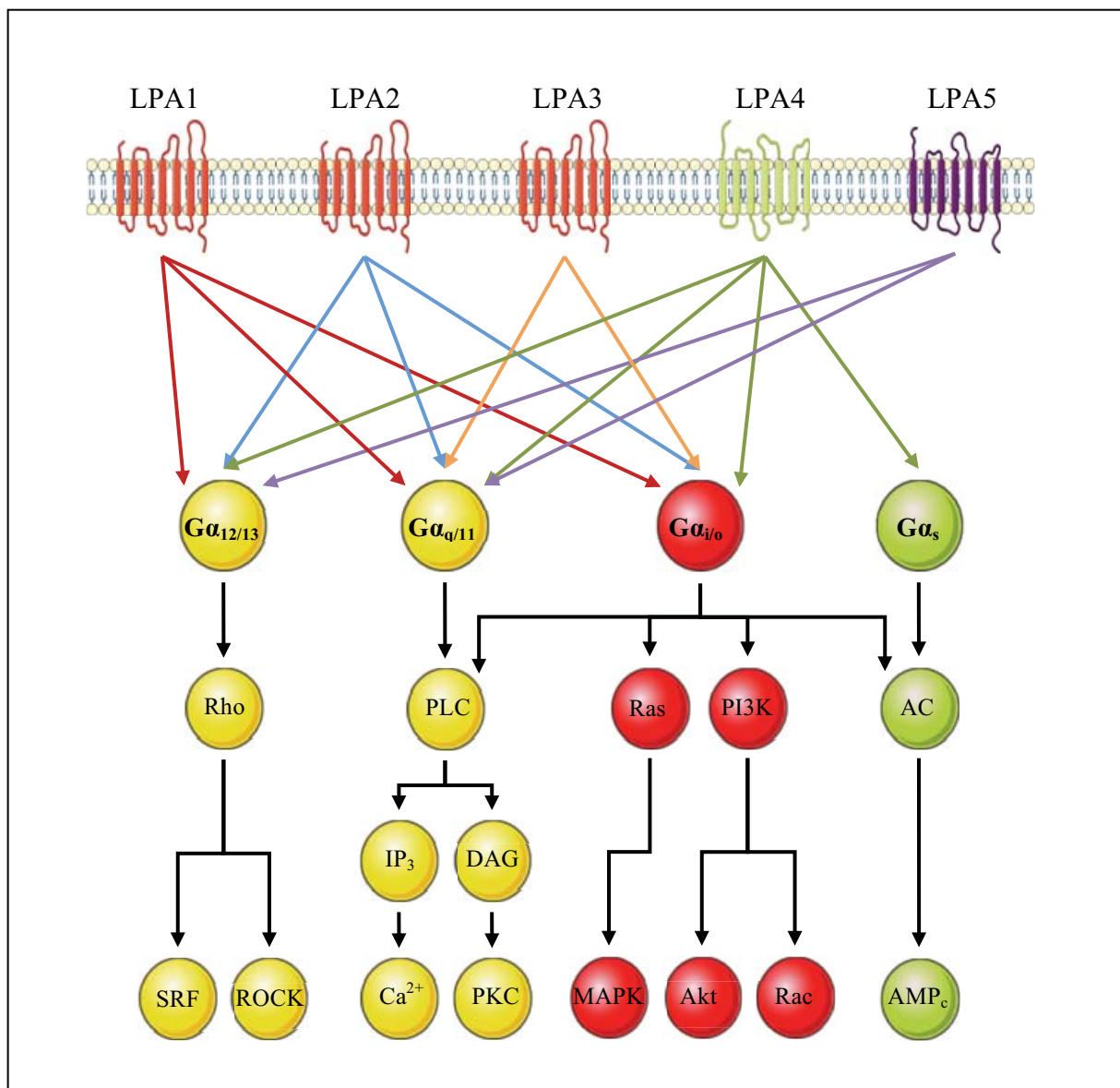


Figure 3 : voies de signalisation couplées aux récepteurs LPA1 à 5

- **Affinités des récepteurs**

Les récepteurs LPA1 à LPA5 ont des affinités distinctes pour les différentes formes de LPA. En effet, contrairement aux récepteurs LPA1 et 2 ayant une forte affinité pour les formes de LPA contenant un acide gras saturé, LPA3 a une forte affinité pour les formes de LPA contenant un acide gras insaturé. Le récepteur LPA4 a lui, une affinité optimale pour les formes de LPA contenant des acides gras monoinsaturés à 18 carbones. LPA5 a une forte affinité pour le LPA, mais il n'est pas totalement spécifique puisqu'il est aussi activable, avec une faible affinité, par le farnesyl pyrophosphate [41]. Ces données concernant les affinités relatives des récepteurs au LPA vis-à-vis des acides gras contenus dans le LPA ne devraient pas être négligées dans les études fonctionnelles. De nombreuses situations modifiant la production, et les taux de LPA global sont aujourd'hui connues. Mais, existe-t-il des situations physiologiques ou pathologiques favorisant la formation de certaines formes de LPA ? L'alimentation elle-même ne peut-elle pas modifier la nature du LPA ? Peu d'études s'intéressent aux effets biologiques du LPA selon la nature de l'acide gras qui le compose, pourtant cela pourrait influencer le type de récepteur activé et donc les voies de signalisation mobilisées.

- **Récepteurs intracellulaires**

Le LPA pourrait aussi être un agoniste du récepteur nucléaire PPAR γ , cependant la relevance physiologique de ce phénomène reste aujourd'hui controversée. Il a été montré en 2003 que du LPA exogène active PPAR γ dans des monocytes en culture par lequel il stimule l'accumulation de lipides intracellulaires et l'expression de gènes cibles [40]. Cependant des travaux de notre équipe démontrent qu'un traitement d'adipocytes de la lignée 3T3F442A par du LPA extracellulaire a un effet anti-adipogénique, donc opposé à l'effet attendu lors d'une activation de PPAR γ , associé à une baisse de l'expression de gènes cibles de PPAR γ [47]. Selon une étude récente, menée sur des cellules de la lignée CHO, la stimulation de PPAR γ dépend du LPA intracellulaire et non du LPA extracellulaire qui ne semble pas pénétrer dans la cellule à travers la membrane plasmique [25]. L'activation par le LPA extracellulaire pourrait être spécifique des monocytes. Cela impliquerait qu'il existe dans ce modèle un mécanisme tel que l'endocytose ou la phagocytose permettant au LPA extracellulaire d'entrer dans la cellule.

B. Autotaxine

Comme décrit précédemment, l'ATX est une enzyme impliquée dans une des principales voies de synthèse du LPA par l'activité lysoPLD qu'elle exerce sur des lysophospholipides.

L'ATX faisant l'objet des principaux résultats expérimentaux acquis durant cette thèse, le chapitre présent est consacré à l'étude de cette enzyme.

1. Profil d'expression de l'autotaxine

La synthèse de l'ATX dépend du gène ENPP2 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2) qui est exprimé dès le développement embryonnaire. Il est exprimé dans la région rostrale et le tube neural au cours des huitième et neuvième jours de développement. L'ATX est ensuite fortement exprimée dans le plexus choroïdien, et les reins [60]. A l'âge adulte, l'ATX est exprimée dans de nombreux types cellulaires et tissus. L'ARNm est majoritairement exprimé dans le cerveau, les ovaires, les poumons et les reins [37]. La structure du gène ENPP2 est identique chez l'homme et la souris. Il est constitué de 27 exons et 26 introns qui par un épissage alternatif conduisent chez les deux espèces à la formation de trois isoformes notées α , β , et γ (Figure 4). La forme α , longue de 915 acides aminés, contient tous les exons à l'exception de l'exon 21 codant pour 52 acides aminés. On retrouve cette ATX- α dans le tissu adipeux et le cerveau chez la souris, elle n'est que faiblement exprimée chez l'homme. La forme β , de 863 acides aminés, ne possède ni l'exon 12 ni l'exon 21 qui code un fragment de 25 acides aminés. Chez la souris cette forme est exprimée largement dans le système nerveux central et les tissus périphériques, alors que chez l'homme elle est plus exprimée en périphérie que dans le système nerveux central. Enfin, la forme γ , de 885 acides aminés (889 chez l'homme) est dépourvue de l'exon 12. Il s'agit d'une forme faiblement exprimée chez la souris, que l'on retrouve majoritairement dans le cerveau chez l'homme [61].

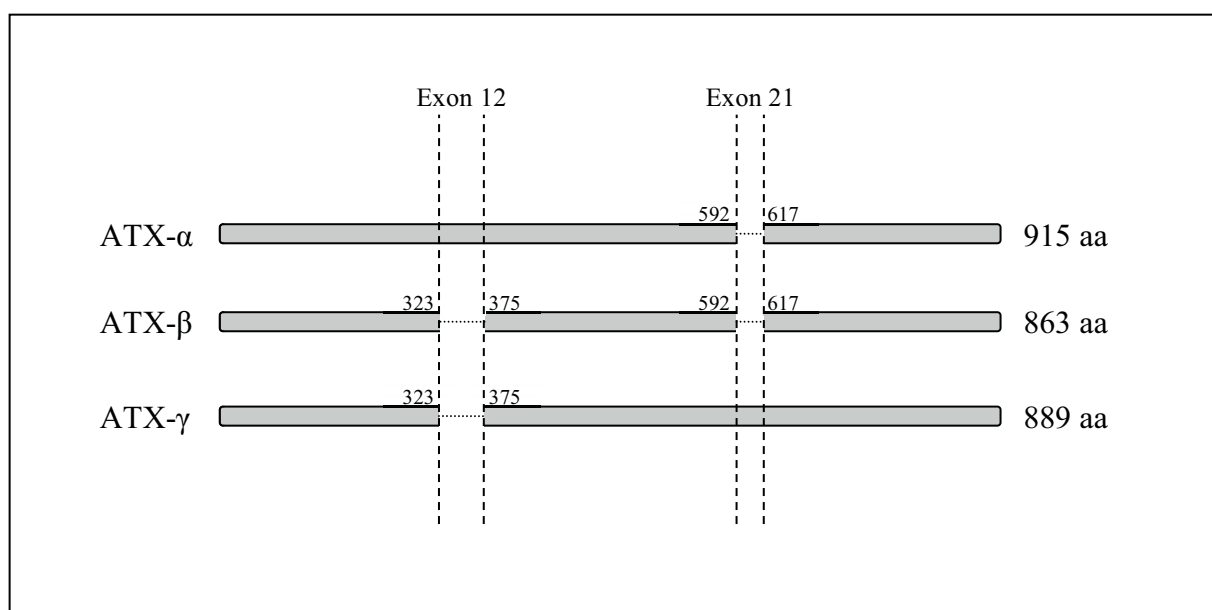


Figure 4 : différentes isoformes de l'autotaxine

L'ATX- α est longue de 915 acides aminés, elle est dépourvue de l'exon 21. L'ATX- β est longue de 863 acides aminés, elle est dépourvue des exons 12 et 21. L'ATX- γ est longue de 889 acides aminés chez l'homme, elle est dépourvue de l'exon 12.

2. Structure de l'autotaxine

Le clonage du gène de l'ATX a conduit à le classer dans la famille des gènes NPP (nucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) en raison de son homologie avec, la nucléotide pyrophosphatase PD-1 α , avec le neural « differentiation antigen » (gp130) et avec la « plasma cell glycoprotein » (PC-1) qui ont des activités nucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase [62-65]. La famille NPP comprend sept membres qui possèdent tous un domaine catalytique phosphodiesterase. Les NPP1, NPP3 mais aussi NPP2, l'ATX, se distinguent par la présence de domaines additionnels : deux domaines « somatomedin B-like » (SMB) N-terminaux, et un domaine « nuclease-like » (NUC) C-terminal [60] (Figure 5). En 2011, la cristallisation de l'ATX a permis d'augmenter considérablement nos connaissances sur la structure de la protéine mais aussi sur les interactions de l'ATX avec d'autres protéines et avec ses substrats enzymatiques [66, 67].

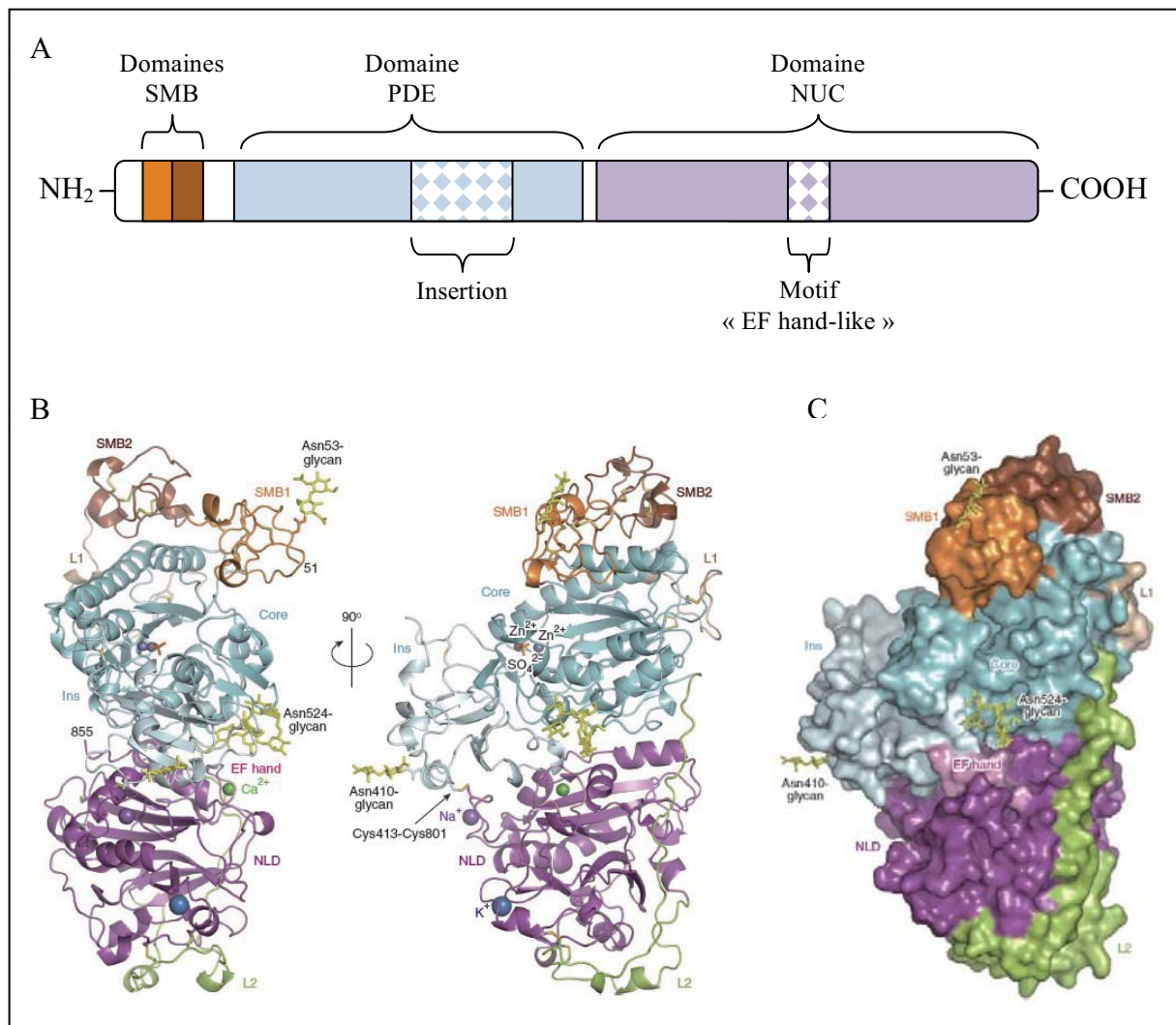


Figure 5 : structure générale de l'autotaxine

A : structure et organisation linéaire des différents domaines de l'ATX ; B : structure en ruban de l'ATX d'après Hiroshi Nishimasu et al., *Nature structural & molecular biology*, 2011 ; C : structure de la surface de l'ATX d'après Hiroshi Nishimasu et al., *Nature structural & molecular biology*, 2011

- **Domaine phosphodiesterase**

Le domaine phosphodiesterase (PDE) est le domaine catalytique de l'ATX, il se compose du « core » (acides aminés 161 à 364 et 471 à 536) et d'une insertion (acides aminés 365 à 470). Le « core » lie un ion sulfate et deux ions Zn^{2+} . Le premier ion Zn^{2+} , qui serait impliqué dans le placement du groupe phosphate des substrats, est placé entre les acides aminés Asp311, His315, His474, le deuxième entre les acides aminés Asp171, Thr209, His359. Ces six acides aminés sont indispensables à l'activité catalytique de l'ATX. Le domaine catalytique PDE interagit fortement avec les deux domaines SMB d'un côté, et avec le domaine « nuclease-like » de l'autre [66, 67].

- **Domaines « somatomedin B-like »**

Les deux domaines SMB de l'ATX interagissent avec le domaine PDE. Alors que l'interaction du domaine SMB1 avec le domaine PDE est conventionnelle, c'est-à-dire qu'elle implique la zone des SMB habituellement impliquée dans les interactions protéine-protéine, l'interaction du domaine SMB2 avec le domaine PDE est particulière. En effet cette interaction n'implique pas cette surface habituellement impliquée dans ce contact protéine-protéine, qui de ce fait reste accessible pour d'autres interactions. Ainsi, les domaines SMB N-terminaux permettent à l'ATX par exemple de se lier aux intégrines $\beta 3$ à la surface des plaquettes activées. Cette liaison implique notamment les acides aminés 119, 122, et 129 du domaine SMB2 [67]. C'est par ce biais que l'ATX se lierait aux plaquettes et aux lymphocytes [68, 69]. On peut émettre l'hypothèse que d'autres types cellulaires puissent se lier à l'ATX par ce mécanisme dépendant des intégrines. Nous aurions alors un système endocrine plus complexe que le système habituel impliquant une cellule endocrine produisant le facteur et une cellule réceptrice. Si un tel mécanisme existait, l'ATX serait synthétisée par une première cellule, et adressée à la membrane d'une deuxième cellule qui pourrait elle-même être une source de substrats pour l'ATX ou porteuse de récepteurs au LPA. Il y aurait alors trois niveaux de régulation dans cette communication de cellule à cellule : l'étape de synthèse et sécrétion de l'ATX, l'adressage de l'ATX, et la sensibilité au LPA de la cible finale. L'étude de l'étape intermédiaire d'adressage de l'ATX, encore peu connue, permettra dans le futur de vérifier cette hypothèse.

- **Domaine « nuclease-like »**

Il y a une interaction « rigide » entre le domaine PDE et le domaine NUC dans sa partie C terminale. Cette interaction est renforcée par un pont cystéine, indispensable à l'activité catalytique, entre les acides aminés 413 et 805 chez l'homme et 413 et 801 chez la souris [70]. La liaison du domaine PDE et du domaine NUC est aussi stabilisée par la glycosylation de

Asn524. D'autres éléments semblent participer à cette interaction entre les deux domaines. Le domaine « nuclease-like » lie des ions Ca^{2+} , Na^+ , et K^+ . Le Ca^{2+} et le Na^+ seraient impliqués dans l'interaction entre les domaines PDE et « nuclease like ». Enfin, des molécules d'eau localisées à l'interface forment un réseau de liaisons hydrogènes entre les deux domaines [66, 67].

Plusieurs fonctions ont été proposées pour le domaine NUC. Il serait potentiellement impliqué dans la liaison et la présentation du substrat. Il a aussi été montré que les 12 acides aminés C-terminaux sont nécessaires à la sécrétion de l'ATX [70].

Il existe au sein du domaine NUC un motif « EF hand-like » proche de celui retrouvé dans les ADN et ARN endonucléases non spécifiques. Ce motif serait cependant dépourvu d'activité catalytique à cause de mutations d'acides aminés indispensables à leur fonction [71]. Le rôle de ce motif « EF hand-like » est controversé. Des premiers travaux montraient que la présence de ce motif n'est pas indispensable à l'activité enzymatique de l'ATX [72]. Ces résultats semblent soutenus par une étude récente, sur l'ATX de souris, montrant que ce motif n'intervient pas dans l'activité lysoPLD de l'ATX, mais semble toutefois nécessaire pour l'activité biologique de l'ATX sur des oligodendrocytes. Il pourrait jouer un rôle en liant des protéines encore inconnues ou dans la structure de l'ATX en liant un ion Ca^{2+} [66]. Cependant des expériences de mutations réalisées sur l'ATX de rat modifiant trois acides aminés du motif « EF hand-like » (D739S, N741A et D743S) entraînent la formation d'une forme d'ATX non sécrétée dont l'activité catalytique est fortement réduite [67].

3. Synthèse et sécrétion

Contrairement aux autres membres de la famille ENPP, en particulier ENPP1 qui s'accumule sur la face extracellulaire de la membrane plasmique à laquelle elle est ancrée [73], l'ATX subit un mécanisme classique de sécrétion. L'ATX est une glycoprotéine d'environ 125 kDa d'abord synthétisée sous forme d'une pré-pro-enzyme immature, contenant un peptide signal N-terminal. Au cours de sa synthèse, l'ATX serait ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique, par un « core » hydrophobe au sein du peptide signal qui serait clivé par une signal-peptidase agissant rapidement au cours de la maturation, vraisemblablement dans le réticulum endoplasmique. Ce modèle de sécrétion de l'ATX est soutenu par les résultats montrant que l'activité d'une signal-peptidase est nécessaire à la sécrétion de l'ATX [74]. De plus, selon les études récentes sur la structure de l'ATX, les acides aminés 1 à 35 composant la séquence signal ne sont plus présents sur l'ATX sécrétée [66, 75].

La maturation post-traductionnelle de l'ATX comprend des glycosylations. L'ATX est N-glycosylée sur les résidus Asn53, Asn410, et Asn524 [66, 76]. Ces glycosylations sont nécessaires à la sécrétion de l'ATX ainsi qu'à son activité. En effet, l'inhibition de cette étape de la maturation par traitement enzymatique entraîne la formation d'ATX non sécrétée et sans activité catalytique. De plus la délétion de l'acide aminé 53 inhibe sa sécrétion, et la délétion de l'acide aminé 410 inhibe sa sécrétion et son activité lysoPLD [74].

Il existe aussi dans la séquence de l'ATX un site de reconnaissance de la furine. Le clivage de ce site par la furine n'est pas nécessaire à la sécrétion de l'ATX, mais pourrait augmenter son activité. Cependant, une faible proportion de l'ATX sécrétée serait concernée par ce clivage, qui n'influencerait donc pas l'activité lysoPLD globalement sécrétée [74, 75].

4. Fonction enzymatique

- **Activités enzymatiques**

Une activité lysoPLD conduisant à la synthèse de LPA a initialement été mise en évidence dans des plasmas de rat en 1986 [77]. L'ATX était connue depuis 1994 comme une PDE (hydrolyse de l'ATP en AMP) sécrétée activatrice de la motilité de cellules cancéreuses [78, 79]. Ce n'est qu'en 2002 que l'ATX a été rendue responsable de l'activité lysoPLD [80, 81]. L'ATX est donc capable de catalyser deux types de réactions enzymatiques : PDE et lysoPLD. Ces réactions nécessitent le même site catalytique, avec la thréonine 209 comme acide aminé essentiel qui formerait une liaison transitoire avec le groupe phosphate des substrats (ATP, lysophospholipides) qui sont ensuite hydrolysés en LPA ou AMP. L'activité PDE de l'ATX s'exerce sur l'ATP pour former préférentiellement de l'AMP et du pyrophosphate par rapport la formation d'ADP et de phosphate [67]. L'activité lysoPLD est l'activité enzymatique majoritaire avec un Km de l'ATX pour les lysophospholipides environ 56 fois plus faible que pour les nucléotides (250 μ M vs 14,1 mM) [80].

- **Substrats**

La liaison à l'ATX des substrats nucléotidiques ou lipidiques fait intervenir un site commun composé des acides aminés Phe210 et Tyr306 (chez la souris). Une poche hydrophobe dans le domaine catalytique, perpendiculaire à la surface de la protéine, constitue une extension du domaine de liaison nécessaire à la liaison spécifique des lysophospholipides. La structure des autres membres de la famille des ENPP, contient une boucle de 19 acides aminés qui renforce la liaison des nucléotides et rend inaccessible la poche hydrophobe liant les lysophospholipides. L'absence de cette boucle dans la séquence de l'ATX engendre une

préférence pour les lysophospholipides comme substrats, privilégiant donc l'activité lysoPLD en défaveur de l'activité PDE [66, 67].

Il existe plusieurs lysophospholipides pouvant être les substrats de l'activité lysoPLD de l'ATX (lysophosphatidylcholine, lysophosphatidyléthanolamine et lysophosphatidylsérine). Le plus représenté dans le plasma est la lysophosphatidylcholine (LPC), produite à partir de la phosphatidylcholine des lipoprotéines. La lysophosphatidyléthanolamine et la lysophosphatidylsérine sont, elles, produites dans le sérum en conditions de coagulation [60]. L'ATX n'a pas d'activité sur les diacyl-phospholipides. Cette spécificité de l'ATX pour les monoacyl-phospholipides pourrait être due à la poche hydrophobe dans le domaine catalytique dont la taille permettrait le positionnement d'une seule chaîne aliphatique excluant ainsi les diacyl-phospholipides [67]. L'acide gras du substrat lysophospholipide influence aussi l'activité enzymatique. L'ATX hydrolyse préférentiellement certaines formes de lysophosphatidylcholines contenant des acides gras insaturés. Les formes de lysophosphatidylcholines contenant, les acides gras de formes oleoyl, linoleoyl et arachidonoyl, sont de meilleurs substrats que les acides gras de formes stearique et arachidique [60]. Ceci serait, là encore, une conséquence de la présence de la poche hydrophobe dans laquelle se place l'acide gras du substrat. Elle ne formerait pas de complexes stables avec les acides gras saturés à 18 carbones mais serait capable de lier les acides gras à 18 carbones s'ils sont insaturés. Sa liaison aux acides gras saturés est possible mais dépend de leur longueur. Elle lierait des gras saturés à 14 carbones avec une meilleure affinité que ceux à 16 carbones [66].

- **Modifications de l'activité enzymatique**

Certaines conditions peuvent modifier l'activité enzymatique de l'ATX. L'activité catalytique optimale est à pH de 8-9 [66]. La spécificité de l'ATX pour son substrat, ainsi que les produits issus de son activité peuvent être modifiés. La structure de l'ATX contient des ions divalents, notamment du Zn^{2+} , nécessaires à son activité. En présence d'ions Co^{2+} ou Mn^{2+} , ceux-ci peuvent prendre la place du Zn^{2+} et modifier la spécificité de l'ATX pour son substrat [72, 82, 83]. En conditions anhydres, l'ATX produira préférentiellement de l'acide phosphatidique cyclique à partir de lysophosphatidylcholine [84].

- **Autre activité enzymatique**

L'ATX est également capable de catalyser la formation de la SIP à partir de sphingosylphosphorylcholine [85]. Cependant, la sphingophosphorylcholine étant présente à de très faibles concentrations dans le plasma, son hydrolyse par l'ATX ne peut pas être à l'origine des taux circulants de SIP [60]. Ceci est confirmé chez les souris hétérozygotes pour

l'ATX chez lesquelles les taux de S1P ne sont pas modifiés alors que les taux de LPA sont réduits de moitié [56, 57].

5. Fonction non enzymatique

L'ATX peut induire des modifications morphologiques d'oligodendrocytes (formation de prolongements cellulaires, adhésions focales) indépendamment de son activité catalytique [86]. Plusieurs hypothèses pour expliquer ces effets sont proposées.

L'ATX contient un domaine MORFO (modulator of oligodendrocyte remodeling and focal adhesion organisation) constitué principalement du domaine NUC, et non du domaine catalytique. Ce domaine MORFO pourrait être impliqué dans cette fonction non enzymatique [87].

Par ailleurs, l'étude de l'ATX cristallisée a mis en évidence un canal, formé par le domaine SMB1 et le domaine catalytique, capable de fixer plusieurs formes de LPA. Cette liaison a peu d'effet sur l'activité lysoPLD de l'ATX, mais elle est impliquée dans la stimulation de la migration cellulaire par l'ATX. Ce canal hydrophobe pourrait donc être impliqué dans l'activité biologique de l'ATX par un mécanisme inconnu [66]. L'hypothèse proposée est que l'ATX pourrait agir comme protéine de transport du LPA, et le présenter à des récepteurs dans certaines situations, notamment lors de la liaison des domaines SMB à d'autres protéines. L'étude plus approfondie de cette liaison du LPA à ce canal, et notamment de son affinité et de sa réversibilité sera nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes des effets non enzymatiques de l'ATX.

La capacité de l'ATX de se lier aux intégrines par ses domaines SMB pourrait permettre, non seulement d'adresser l'activité enzymatique de l'ATX au niveau de cellules cibles comme nous l'avons vu précédemment, mais aussi être impliquée dans une fonction non enzymatique de l'ATX [67]. En effet l'ATX pourrait agir elle-même comme ligand des récepteurs que constituent les intégrines au niveau de la membrane plasmique de cellules cibles, et induire la stimulation de nombreuses voies de signalisation couplées directement aux intégrines ou par transactivation d'autres récepteurs [88].

C. Pharmacologie du couple autotaxine/LPA

1. Les inhibiteurs de l'autotaxine

Les inhibiteurs pharmacologiques de l'ATX sont encore peu nombreux, mais quelques molécules potentiellement utilisables pour étudier le rôle de l'ATX, voire comme traitements de certaines pathologies, ont récemment été identifiées. De plus, l'ensemble des informations

obtenues grâce à la cristallisation récente de l'ATX devraient permettre d'améliorer encore l'efficacité et le nombre de ces outils.

Des molécules telles que le palmitoyl α -bromométhylène phosphonate (BrP-LPA) et le NSC 48300 diminuent la croissance tumorale chez la souris et la motilité de cellules tumorales *in vitro*. La stimulation de la différenciation des ostéoclastes par le LPA, qui est un mécanisme impliqué dans la progression des métastases osseuses, est bloquée en culture par le vpc8a202. Cependant ces agents pharmacologiques dérivés de lipides doivent être présents à de fortes concentrations de l'ordre du micromolaire pour inhiber les effets biologiques de l'ATX [89-91].

Le S32826, un phosphonate aromatique, a été le premier composé capable d'inhiber *in vitro* l'activité lysoPLD de l'ATX avec une IC₅₀ de 1 nM. Bien qu'il ait été montré une inhibition de la prolifération de cellules tumorales en culture par le S32826, cette molécule ne peut être utilisée *in vivo* du fait de sa mauvaise biodisponibilité et de sa faible stabilité [92]. La mauvaise biodisponibilité du S32826 est due à sa structure fortement lipophile qui diminue sa solubilité en solution aqueuse. Des dérivés du S32826 ont été synthétisés afin d'augmenter sa polarité et de diminuer son hydrophobicité. Ces transformations ont permis d'augmenter sa solubilité, mais ont aussi diminué son efficacité sur l'ATX *in vitro*. L'efficacité de ces dérivés du S32826 *in vivo* reste encore inconnue [93].

Des inhibiteurs de l'ATX non lipidiques ont aussi été développés. L'ajout d'un acide boronique à la structure de ces inhibiteurs a permis d'augmenter leur efficacité. L'acide boronique améliore l'efficacité de ces inhibiteurs en se liant par une liaison covalente réversible à la thréonine 210 du site catalytique de l'ATX [32]. De plus, en interagissant avec les deux ions Zn^{2+} , l'atome de bore stabilise la localisation de l'inhibiteur dans le site catalytique [67]. Un de ces inhibiteurs est le HA130, une thiazolidinedione contenant un acide boronique. Il bloque l'activité de l'ATX avec une IC₅₀ d'environ 30 nM. Une administration intraveineuse de ce composé diminue les taux plasmatiques de LPA chez la souris [94].

L'inhibiteur de l'ATX dont l'efficacité *in vivo* semble la plus avérée est le PF-8380. Cet inhibiteur agit avec une IC₅₀ de 2,8 nM sur l'ATX purifiée, et de 101 nM sur du sang humain. Cet inhibiteur peut être administré par voie orale avec une bonne biodisponibilité. Une administration *per os* à la dose de 30 mg/kg chez le rat diminue de 95% les taux de LPA ainsi que l'hyperalgésie [95].

2. Les antagonistes des récepteurs au LPA

La plupart des antagonistes des récepteurs au LPA ciblent les récepteurs LPA1 et LPA3. Plus récemment quelques études ont porté sur des antagonistes du récepteur LPA4, mais ceux-ci ont encore une très faible sélectivité [96]. La majorité de ces molécules ont montré une certaine efficacité *in vitro*, mais peu d'études ont démontré leur action *in vivo* [41].

- **Le Ki16425**

Le Ki16425 est un antagoniste des récepteurs LPA1 et LPA3 et dans une moindre mesure du récepteur LPA2. Il inhibe des réponses induites par le LPA sur des cellules en culture ou des explants telles que la prolifération, la migration ou la rétraction de neurites [97, 98]. Plusieurs études ont démontré l'efficacité du Ki16425 *in vivo* dans différents domaines de recherche. Il diminue la formation de métastases osseuses dans un modèle de xénogreffes de tumeurs mammaires [99]. Un traitement par le Ki16425 réduit la fibrose rénale induite par une obstruction urétérale unilatérale chez la souris [50]. Le Ki16425 bloque aussi la stimulation par le LPA de la sécrétion de prostaglandines par l'utérus chez la vache [100]. Enfin une étude démontre que le Ki16425 bloque précocement l'induction de douleurs neuropathiques. Cette dernière étude met cependant en évidence la faible durée de vie du Ki16425 *in vivo* puisqu'il n'est plus actif 90 min après son injection [101].

- **Le VPC12249**

Le VPC12249, analogue du LPA, est un antagoniste des récepteurs LPA1 et LPA3. Il a été étudié *in vivo* chez la souris où il diminue les conséquences d'une ischémie/reperfusion du rein [102]. La modification chimique du VPC12249 a abouti à la production du VPC32183 dont la spécificité et l'affinité pour les récepteurs sont augmentées [98].

- **L'AM966**

L'AM966 est un antagoniste spécifique du récepteur LPA1. *In vitro*, il inhibe la libération du Ca^{2+} intracellulaire avec une IC_{50} de 17 nM et bloque l'effet chémoattractant du LPA sur les fibroblastes humains avec une IC_{50} de 181 nM. *In vivo*, l'AM966 dispose d'une bonne biodisponibilité lorsqu'il est administré par voie orale. Une étude montre qu'il est capable de réduire plusieurs effets dans lesquels le LPA est impliqué tels que l'inflammation, les lésions et la fibrose pulmonaires induites par la bléomycine chez la souris [103].

- **L'AM095**

L'AM095 est lui aussi un antagoniste spécifique du récepteur LPA1. Il inhibe le couplage du récepteur à la sous unité γ_s des protéines G dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) surexprimant le récepteur LPA1 humain ou murin avec une IC_{50} de 0,98 et 0,93 μM

respectivement. Il s'oppose aux effets chémoattractants du LPA sur plusieurs lignées cellulaires. Chez la souris, *in vivo*, l'AM095 administré par voie orale prévient l'apparition de la fibrose induite par la bléomycine dans les poumons et par une obstruction urétérale unilatérale dans les reins. Cet effet s'opposant à la fibrose induite par la bléomycine est aussi démontré au niveau cutané chez la souris, lors d'un traitement préventif mais aussi curatif. Cependant l'AM095 n'a pas d'effet sur la cicatrisation cutanée chez le rat [104, 105].

3. Les PA cycliques

Des formes de PA cycliques sont retrouvées dans le sang et le cerveau des mammifères. Le PA cyclique est un analogue du LPA dans lequel le groupement hydroxyl en position 2 du glycérol forme un cycle avec le groupement phosphate. Au niveau intracellulaire, le PA cyclique peut être formé par la PLD2. L'ATX peut aussi permettre la formation de PA cyclique en catalysant la transphosphatidylolation de phospholipides. Mais ceci n'a été observé qu'*in vitro*, dans des conditions non physiologiques où l'ATX est localisée à l'interaction d'une phase aqueuse et d'une phase éther. L'origine du PA cyclique dans le sang demeure inconnue [106].

Ces PA cycliques agissent à deux niveaux : sur les récepteurs au LPA et sur l'ATX [84]. Les PA cycliques sont de faibles activateurs des récepteurs LPA1, LPA2, LPA3 et LPA4 et ont des effets biologiques opposés à ceux du LPA : ils bloquent la prolifération et inhibent l'invasion tumorale [107, 108]. Cet effet est renforcé par leur capacité à inhiber l'ATX, et donc réduire la quantité de LPA produit [37]. L'importance physiologique des PA cycliques demeure incertaine. Le peu d'informations disponibles actuellement sur leur production physiologique et leur régulation ne permet pas de déterminer clairement s'ils jouent un rôle régulateur de la signalisation du LPA.

A ce jour les PA cycliques sont principalement considérés comme de potentiels agents pharmacologiques utilisables contre les pathologies impliquant l'ATX et le LPA. Cependant leur utilisation pharmacologique nécessitera des phases d'études et de développement de ces molécules afin de répondre à certaines incertitudes. La possibilité de reformer du LPA par hydrolyse du cycle phosphate, par une PLD ou l'ATX elle-même, pourrait dans certaines conditions aboutir à une augmentation a posteriori de la concentration en LPA et donc de ses effets [84]. De plus, la demi-vie de ces formes cycliques est limitée par l'action de phospholipases clivant la liaison à l'acide gras. Des travaux ayant pour but d'améliorer le fonctionnement des PA cycliques ont été récemment publiés. Ainsi, il a été montré que du PA carbacyclique, c'est-à-dire une forme de PA cyclique dont l'oxygène du groupe phosphate est

substitué par un groupe méthylène en position sn-2 ou sn-3 semble plus efficace que le PA cyclique pour inhiber la migration cellulaire et la formation de métastases [109].

D. Fonctions biologiques du couple autotaxine/LPA

1. Système cardiovasculaire

Le LPA participe à la tonicité et au maintien de l'intégrité vasculaire. Il joue un rôle hypertenseur en augmentant la contraction des cellules musculaires lisses mais aussi la contraction et la migration des cellules endothéliales et des fibroblastes en activant des voies dont celles de la protéine Rho, des ERK, et par régulation du cytosquelette d'actine et de la matrice extracellulaire [37, 110, 111].

Le LPA est impliqué au cours du processus d'hémostase. Suite à un dommage vasculaire, une thrombose, ou un infarctus du myocarde, le LPA augmente dans le sérum grâce à sa libération par les plaquettes [37]. L'activation des plaquettes humaines par le LPA a été l'un des premiers effets du LPA décrits. Il entraîne des modifications de la morphologie des plaquettes, stimule l'assemblage de la matrice de fibronectine, et la formation de coagrégats de plaquettes et de monocytes. Ainsi, le LPA intervient dans la formation et le maintien du thrombus [111]. Le LPA participe aussi à la réparation des lésions vasculaires. Il augmente la synthèse de métalloprotéinases impliquées dans la réparation des tissus [37]. De plus, une étude récente montre que le LPA est impliqué, via les récepteurs LPA1 et LPA3, dans la reformation de l'intima des vaisseaux en recrutant des progéniteurs de cellules musculaires lisses par un mécanisme faisant intervenir CXCL12 [112].

Le LPA augmente l'expression de gènes impliqués dans l'angiogénèse : le « vascular endothelium growth factor » (VEGF) et l'interleukine 8 (IL-8). Le rôle du LPA dans l'angiogénèse a été démontré dans plusieurs modèles dont la souris [113-115]. Ces effets laissent envisager que le LPA pourrait intervenir dans des processus d'angiogénèse réparatrice, notamment après des événements ischémiques tels que l'infarctus du myocarde.

Cependant les effets décrits du LPA sur le système cardiovasculaire peuvent aussi s'inscrire dans des mécanismes pathologiques. Ainsi, le LPA pourrait être impliqué dans le développement de l'athérosclérose [37]. Il joue un rôle dans l'initiation de l'athérosclérose par les LDL oxydées qui sont une source de LPC qui est convertie en LPA par l'ATX. Ce LPA produit dans les vaisseaux va, via les récepteurs LPA1 et LPA3, activer les cellules endothéliales qui vont exprimer à leur surface le « Chemokine, CXC Motif, Ligand 1 »

(CXCL1). Les monocytes vont alors adhérer à la paroi vasculaire et initier la formation de la plaque d'athérome [116].

2. Inflammation et réponse immunitaire

Le LPA modifie la migration, l'adhésion et l'activation de cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes T et B, les monocytes, et les mastocytes [37]. Plusieurs exemples soutiennent un rôle anti-inflammatoire du LPA. Une injection de LPA permet de réduire la mortalité, les lésions, et la production de $\text{TNF}\alpha$, engendrées par une injection de lipopolysaccharide. Les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène restent controversées, les récepteurs LPA1 et LPA3 semblent le plus souvent engagés dans cette réponse anti-inflammatoire alors que le rôle de $\text{PPAR}\gamma$ est plus incertain [117, 118].

Cependant, de nombreuses études attribuent aussi un rôle au LPA dans la mise en place d'épisodes inflammatoires. Ainsi, le LPA est impliqué par son effet proinflammatoire dans l'asthme et les allergies [37]. Une étude montre que l'expression de l'ATX est augmentée dans les synoviocytes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, suggérant l'implication de l'ATX dans la pathologie [119]. Une étude récente montre que la stimulation des récepteurs LPA1 et LPA3 par le LPA entraîne le recrutement de leucocytes sur un site inflammatoire *in vivo* chez la souris. Ce recrutement nécessiterait la sécrétion de chémokines telles que CXCL1, IL-6 et IP-10 [120].

Ces effets apparemment contradictoires du LPA sur l'inflammation pourraient être dus au type et à l'état d'activation des cellules immunitaires impliquées dans les différentes réponses étudiées. En effet des profils d'expression des récepteurs au LPA différents entre ces différentes cellules pourraient en partie expliquer des réponses inflammatoires opposées selon le contexte [121].

3. Reproduction et développement

L'ATX et le LPA jouent des rôles multiples dans la fonction reproductrice. Le LPA est présent à une concentration d'environ 20 μM dans le liquide folliculaire, et augmente au niveau plasmatique au cours de la gestation [110]. Le récepteur LPA3 est nécessaire pour une implantation normale de l'embryon chez la souris [37].

L'ATX est indispensable au développement embryonnaire. L'inactivation totale du gène *ENPP2* est létale au cours des 9^{ème} – 10^{ème} jours de développement chez la souris. Cette létalité serait due à des défauts de vascularisation du sac vitellin, à une formation anormale des lysosomes dans l'endoderme viscéral ainsi qu'à un développement anormal et retardé du

tube neural [60]. L'invalidation du récepteur LPA4 reproduit en partie les effets de l'absence de l'ATX sur le développement embryonnaire, tels que des défauts de vascularisation au cours de l'embryogénèse [55]. D'autres récepteurs au LPA semblent jouer un rôle redondant ou complémentaire dans le développement embryonnaire. En particulier le récepteur LPA1 dont la délétion est responsable d'un mauvais développement du système nerveux central. Mais la perte du récepteur LPA1 contrairement à l'invalidation de l'ATX n'est pas létale au cours du développement embryonnaire précoce [46].

Le LPA joue aussi un rôle dans le développement postnatal. En effet, la délétion du récepteur LPA1 conduit à une mortalité néonatale de 50% due à une perturbation de l'olfaction et à une diminution du comportement de succion des nouveau-nés [46].

4. Cancer

Les effets de l'ATX et du LPA les plus décrits dans la littérature concernent leurs rôles dans le développement de nombreux cancers. On trouve du LPA dans les biopsies de tumeurs du colon, dans les ascites de patients atteints de cancer, en particulier de cancer ovarien [122, 123]. Il est suggéré que le LPA pourrait être un marqueur précoce de ce cancer [37]. L'expression des récepteurs au LPA est, elle aussi, augmentée dans certaines tumeurs : LPA2 dans le cancer colorectal et les carcinomes thyroïdiens, LPA2 et LPA3 dans les cancers ovariens, LPA1, LPA2 et LPA3 dans des lignées cellulaires de cancers du sein [37]. Enfin, une surexpression de l'ATX a été mise en évidence dans de nombreux tissus tumoraux comme le lymphome de Hodgkin, les glioblastomes, le cancer du poumon non à petites cellules, les carcinomes rénaux, les carcinomes hépatocellulaires, les cancers du sein et les carcinomes thyroïdiens [60]. La concentration en ATX elle-même, ainsi que son activité, sont augmentées dans les *sera* de lymphomes folliculaires [124]. Des études impliquent le LPA et l'ATX à tous les niveaux du processus cancéreux, l'initiation, la croissance tumorale, et la formation de métastases. Ainsi, la surexpression de l'ATX dans les glandes mammaires de souris initie un processus cancéreux et stimule sa progression et la formation de métastases osseuses [125, 126]. Dans le cancer des ovaires, le LPA stimule la croissance, le développement, et les métastases des tumeurs [37].

- **Prolifération et survie cellulaire**

Certains soutiennent l'idée selon laquelle, les récepteurs LPA2 et LPA3 seraient impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses alors que LPA1 serait responsable de la migration de ces cellules. Cependant LPA1 stimule aussi la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses mammaires et de la prostate [37]. Cette stimulation de la prolifération de

cellules humaines de cancer de la prostate implique le couplage du récepteur LPA1 à une protéine Gai qui engendre une augmentation de la localisation nucléaire de récepteurs aux androgènes, eux-mêmes responsables de la prolifération cellulaire [127]. D'autre part, la découverte des nouveaux récepteurs au LPA pourrait renforcer la compréhension du rôle du LPA dans la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, il a été montré que le récepteur GRP87, possible récepteur au LPA, régule la prolifération et la survie de cellules de lignées tumorales par un processus impliquant p53 dans la réparation de l'ADN endommagé [128, 129].

- **Migration**

Le récepteur LPA1 est impliqué dans la migration de cellules tumorales et donc dans les processus d'invasion et de métastase au cours du cancer [37]. Ceci a été démontré, *in vitro*, où l'ATX stimule la migration tumorale par un mécanisme impliquant le recrutement des petites protéines G RhoA et Rac1 par le LPA et son récepteur LPA1 [130]. Le LPA augmente aussi la production de métalloprotéases, ce qui pourrait favoriser les processus métastatiques en modifiant la matrice extracellulaire dans le microenvironnement de la tumeur [131].

- **Angiogénèse**

L'ATX serait aussi impliquée dans l'angiogénèse, elle stimule par exemple la prolifération de cellules endothéliales et la formation de tubules par ces cellules dans du matrigel [132]. Le LPA induit une augmentation du VEGF, ce qui pourrait favoriser l'angiogénèse au niveau des tumeurs [131].

- **Résistance aux traitements**

Le LPA a un effet anti-apoptotique sur des cellules cancéreuses ou des cellules normales traitées au cisplatine ou irradiées [131]. Cet effet anti-apoptotique entraîne une résistance au taxol de lignées de cancers du sein [133]. Cependant des études suggèrent aussi un rôle positif du couple ATX/LPA dans certains traitements. Le récepteur LPA2 couplé à une protéine Gi/o et aux voies d'Akt et des MAP Kinases protège l'épithélium intestinal des dommages induits par des radiations et chimiothérapies en inhibant la caspase-3 [134, 135]. Ceci fait du récepteur LPA2 une cible potentielle pour améliorer les traitements anticancéreux. Le récepteur LPA2 pourrait être inhibé afin d'améliorer l'efficacité des traitements sur les cellules cancéreuses, mais il est aussi envisageable de stimuler ce récepteur pour limiter les effets secondaires des traitements, notamment sur l'épithélium intestinal.

5. Maladies neurologiques

L'ATX est fortement exprimée par les plexus choroïdiens et retrouvée dans le liquide céphalorachidien. En conditions normales, l'absence apparente de lysophospholipides dans ce milieu ne permettrait pas la production de LPA par l'ATX. Lors de stress inflammatoires ou de lésions, une augmentation de la perméabilité vasculaire entraînerait le passage de lysophospholipides vers le liquide céphalorachidien, ce qui permettrait alors la production de LPA par l'ATX [60].

Plusieurs effets du LPA sur les cellules nerveuses ont été décrits. Le LPA est impliqué dans un processus de démyélinisation démontré chez les souris invalidées pour le récepteur LPA1 [136, 137]. Le LPA peut aussi, par l'activation du récepteur LPA4, inhiber la croissance de neurones et la différenciation de lignées neuronales *in vitro* [60].

Le LPA ainsi que l'ATX sont associés à certaines pathologies touchant le système nerveux. Par exemple, l'expression de l'ATX est augmentée dans le cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. On observe aussi une augmentation de l'ATX dans le liquide céphalorachidien de patients atteints de scléroses multiples [37]. Des études montrent l'implication de l'axe ATX/LPA dans des processus neuropathologiques tels que les douleurs neuropathiques. Une lésion nerveuse induit une production de LPA en partie par l'ATX [138]. Le LPA est lui-même responsable de douleurs neuropathiques par un mécanisme impliquant le récepteur LPA1 et la protéine Rho [49, 139]. De plus les animaux hétérozygotes pour l'ATX, qui produisent moins de LPA, sont moins sensibles aux douleurs induites par des lésions neuronales [140]. L'axe ATX-LPA influence aussi le comportement. Des souris invalidées pour le récepteurs LPA1 ont une anxiété augmentée, explorent peu leur environnement et présentent une mémoire réduite [141].

6. Processus de cicatrisation et de réparation

Le LPA participe à la cicatrisation de nombreux tissus tels que la cornée, l'épithélium gastrique et la peau [110]. Le LPA salivaire semble participer à la réparation des lésions de la partie supérieure du tractus digestif. Il accroît par exemple la prolifération de culture de cellules issues de l'œsophage, du pharynx, ou de la langue. Une application locale de LPA augmente la cicatrisation de blessures cutanées ou la réparation de l'épithélium intestinal [37].

7. Fibrose

De manière générale, la fibrose peut être considérée comme un processus menant à l'accumulation excessive de matrice extracellulaire et conduisant à des altérations

fonctionnelles des organes cibles. La fibrose peut être considérée comme une dérégulation du processus de cicatrisation dans lequel le rôle du LPA a été précédemment décrit. Le LPA est capable de stimuler la transdifférenciation de plusieurs types cellulaires en myofibroblastes exprimant le marqueur « α -Smooth Muscle Actin » (α -SMA), ceci constitue une étape déterminante du processus fibrotique. Cet effet du LPA pourrait passer par sa capacité à augmenter l'expression du « connective tissue growth factor » (CTGF) grâce aux voies de signalisation de la Rho-kinase, de « l'intégrin-linked kinase » et par la transactivation des récepteurs au « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β) et de la voie des « c-Jun N-terminal kinases » (JNK). La capacité du LPA à stimuler la contraction cellulaire et l'assemblage de la fibronectine pourrait elle aussi accroître l'effet profibrotique du LPA [142].

- **Fibrose rénale**

L'induction de la fibrose rénale chez le rongeur par une obstruction urétérale unilatérale est accompagnée d'une augmentation de l'expression du récepteur LPA1 et de la production de LPA par le rein [50]. Cette augmentation est aussi observée dans un autre modèle de fibrose rénale chronique induite par un sérum néphrotoxique [143]. Plusieurs faits démontrent l'implication du LPA dans la mise en place de la fibrose rénale. En effet la fibrose décrite dans le modèle de l'obstruction urétérale unilatérale est significativement réduite chez des souris invalidées pour le récepteur LPA1, et par des traitements par les antagonistes Ki16425 et AM095 [50, 104].

- **Fibrose pulmonaire**

Le LPA est aussi un acteur majeur de la fibrose pulmonaire. Il est retrouvé dans le liquide broncho-alvéolaire, où sa concentration augmente lors d'une fibrose induite par la bléomycine chez la souris [51]. Les situations de fibroses pulmonaires semblent aussi accompagnées d'une augmentation de l'expression des récepteurs LPA1 et LPA3 y compris chez l'homme où le récepteur LPA1 est surexprimé dans des fibroblastes issus de patients atteints de fibrose pulmonaire [142].

Que ce soit par l'utilisation de souris invalidées pour le gène du récepteur LPA1 ou par des traitements avec des agents pharmacologiques AM966 et VPC-12249, antagonistes des récepteurs LPA1 et LPA1 et LPA3 respectivement, l'induction de la fibrose par la bléomycine ou par des irradiations est réduite [103, 104, 144, 145]. Ceci confirme le rôle majeur de la signalisation du LPA dans cette pathologie. L'effet pro-fibrotique du LPA et de son récepteur LPA1 dans les poumons passerait par une augmentation de la perméabilité vasculaire, et du recrutement de fibroblastes [142].

- **Fibrose artérielle**

La fibrose artérielle se caractérise par une formation excessive de néointima dans la paroi artérielle, due à l'hyperplasie de cellules musculaires lisses dédifférenciées [142]. Cette dédifférenciation en cellules proches de myofibroblastes productrices de matrice extracellulaire est stimulée *in vitro* par le LPA [146, 147]. *In vivo*, le LPA contenu dans des LDL oxydées serait impliqué dans le surdéveloppement de l'intima [148]. De plus, une lésion de la carotide chez la souris entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs LPA1, LPA2 et LPA4 ainsi que de l'ATX. La délétion du récepteur LPA2 chez ces souris diminue la formation excessive d'intima [149]. Chez les souris apoE^{-/-}, modèle courant d'athérogénèse, les récepteurs LPA2 et LPA3 sont aussi surexprimés alors que l'expression du récepteur LPA1 est diminuée en réponse à une lésion vasculaire. Un traitement de ces souris avec du Ki16425 diminue la formation de néointima [112].

- **Fibrose hépatique**

Le LPA et l'ATX semblent aussi impliqués dans la fibrose hépatique. La concentration en LPA est corrélée avec des marqueurs de fibrose hépatique chez l'homme atteint d'hépatite C chronique mais aussi dans des modèles animaux de fibrose induite chimiquement [150, 151]. *In vitro*, le LPA active les myofibroblastes [152] hépatiques et augmente la prolifération et la survie de certaines cellules du foie capables de se différencier en myofibroblastes, les cellules étoilées ou « steate cells » [153, 154].

E. Méthodes de dosage de l'activité enzymatique de l'autotaxine

Du fait de la présence dans certains fluides biologiques de l'ATX en corrélation avec certaines pathologies, comme dans le liquide péritonéal de patientes atteintes de pathologies gynécologiques (cancer de l'ovaire, kyste dermoïde ou cystadénome mucineux) [155], il pourrait être envisagé de l'utiliser comme marqueur de diagnostic ou de pronostic. Cela nécessitera l'emploi de méthodes de dosage simples et hautement sensibles. Les premières techniques mises au point pour mesurer l'activité de l'ATX dans un échantillon biologique utilisaient de la LPC radiomarquée comme substrat. Le LPA radiomarké formé devait ensuite être extrait et quantifié. Par la suite des méthodes permettant de doser directement le LPA par chromatographie gazeuse, spectrométrie de masse ou dosage radio-enzymatique ont été mises au point et utilisées pour déterminer l'activité lysoPLD dans un échantillon [156, 157]. D'autres techniques reposent elles sur le dosage de la choline libérée lors de l'hydrolyse de la LPC en LPA par l'ATX [80]. Il s'agit là de techniques simples et sensibles, cependant leur utilisation en clinique nécessiterait une adaptation afin de les utiliser à haut débit. Des

substrats fluorescents ont récemment été mis au point et pourraient être utilisés dans ce but. Ces substrats de l'ATX contiennent au sein d'une même molécule soit un fluorochrome et un « quencheur » qui absorbe la fluorescence émise par le premier, soit deux fluorochromes entre lesquels se déroule un mécanisme de FRET (fluorescence resonance energy transfer). L'activité catalytique de l'ATX sur ces substrats permet de séparer le fluorochrome du « quencheur » ou les deux fluorochromes, les phénomènes de « quenching » ou de FRET sont alors interrompus. L'activité de l'ATX peut alors être étudiée en mesurant la modification de la fluorescence émise par le substrat [158, 159].

F. Le couple autotaxine/LPA dans le tissu adipeux

1. Le LPA dans le tissu adipeux

- **Production de LPA par le tissu adipeux**

Il a été montré dans notre équipe en 1998 que la dégradation des lysophospholipides présents dans des MC d'adipocytes, par une phospholipase B (PLB), bloquait l'effet prolifératif de ces MC sur des préadipocytes en culture. Le LPA présent dans ces MC, est le facteur responsable de ces effets prolifératifs. Parallèlement à ces études *in vitro*, des expériences de microdialyse ont permis de mettre en évidence la présence de LPA *in vivo* dans le liquide interstitiel de tissu adipeux sous cutané chez l'homme [6, 160].

- **Récepteurs au LPA dans le tissu adipeux**

Le récepteur au LPA le plus représenté dans le tissu adipeux, chez l'homme et la souris, est le récepteur LPA1. Les récepteurs LPA2, LPA3 et LPA4 sont eux, peu exprimés [47, 161]. Le tissu adipeux exprime aussi le facteur de transcription PPAR γ 2 bien que son activation par le LPA extracellulaire n'ait pu être démontrée dans le tissu adipeux [47]. Au sein du tissu adipeux, la fraction stroma-vasculaire exprime 3 à 5 fois plus le récepteur LPA1 que les adipocytes. De plus l'expression du récepteur LPA1 diminue avec la différenciation adipocytaire. Il semblerait donc que la cible principale du LPA dans ce tissu soit le préadipocyte, plutôt que l'adipocyte [47, 161].

2. L'autotaxine dans le tissu adipeux

La présence d'une activité lysoPLD sécrétée par du tissu adipeux et des adipocytes a tout d'abord été mise en évidence dans des MC. Lorsque des MC d'explants de tissu adipeux humain ou d'adipocytes 3T3F442A, qui ne contiennent pas de cellules, sont incubés à 37°C, la quantité de LPA dans ces milieux augmente [160]. Ceci implique la présence dans ces

milieux d'une activité enzymatique permettant la synthèse de LPA. Le facteur responsable de cette activité enzymatique a été purifié puis identifié comme étant l'ATX [162].

Au sein du tissu adipeux de souris, l'ATX est exprimée plus fortement dans les adipocytes matures que dans la fraction stroma-vasculaire. Les préadipocytes de la lignée murine 3T3F442A, ou issus de cultures primaires n'expriment que très faiblement l'ATX. Cette expression augmente fortement avec la différenciation adipocytaire [162]. Ce même phénomène a été observé lors de la différenciation adipocytaire de cellules souches embryonnaires de souris [163].

Les mécanismes contrôlant l'expression de l'ATX dans les adipocytes ne sont pas clairement établis. Le traitement d'adipocytes par un ligand du facteur de transcription PPAR γ réprime fortement l'expression de l'ATX alors qu'il stimule lui-même fortement la différenciation adipocytaire. Inversement le TNF α inhibe la différenciation adipocytaire et augmente l'expression de l'ATX [164]. Ces effets opposés sur la différenciation et l'expression de l'ATX suggèrent que l'expression de l'ATX n'est pas directement liée à la différenciation de l'adipocyte mais à d'autres facteurs ou mécanismes. On peut émettre l'hypothèse d'une stimulation de l'expression de l'ATX par le stress oxydant ou l'hypoxie qui augmentent avec la différenciation adipocytaire.

L'étude, chez des modèles murins, de la régulation de l'ATX dans le tissu adipeux a montré une surexpression chez les souris *db/db* obèses et diabétiques, alors que cette expression n'est pas augmentée chez des souris rendues obèses mais non diabétiques par un régime gras de huit semaines ou un traitement par l'aurothiogluucose [162, 164]. De même, chez l'homme, il n'y a pas de corrélation entre l'indice de masse corporelle et l'expression de l'ATX dans le tissu adipeux mais cette expression est significativement augmentée chez des patientes présentant une obésité morbide associée à une intolérance au glucose [164]. Ces résultats semblent indiquer que l'expression de l'ATX n'est pas liée directement à la masse de tissu adipeux mais plutôt au niveau de résistance à l'insuline des adipocytes et/ou à leur statut inflammatoire.

3. Rôles du couple autotaxine/LPA dans le tissu adipeux

Il a été montré *in vitro* sur des préadipocytes de la lignée murine 3T3F442A que le LPA augmente la prolifération de ces cellules [6, 161]. Le LPA a aussi une action inhibitrice sur la différenciation adipocytaire. Il diminue l'accumulation de triglycérides et l'expression des gènes marqueurs de la différenciation des adipocytes tels que PPAR γ 2 [47]. Ceci est confirmé par l'étude de préadipocytes isolés provenant de souris invalidées pour le gène du récepteur

LPA1 et cultivés *in vitro*. Ces cellules ont une plus forte capacité à se différencier en adipocytes et sont insensibles à l'effet anti-adipogénique du LPA. *In vivo*, sous régime nutritionnel normal, ces souris dépourvues de récepteur LPA1 ont une masse de tissu adipeux plus élevée que les souris contrôles [47]. Cependant il n'a pu être démontré que ce développement de la masse grasse *in vivo* soit du directement à la levée de l'effet anti-adipogénique du LPA. Un accroissement du tissu adipeux peut se faire par deux mécanismes : l'hyperplasie, c'est-à-dire l'augmentation du nombre d'adipocytes par prolifération et différenciation des préadipocytes, et l'hypertrophie qui correspond à l'augmentation de la taille adipocytaire par accumulation de lipides sous la forme de triglycérides dans la gouttelette lipidique. Le récepteur LPA1 étant exprimé par les préadipocytes et non les adipocytes, le couple ATX/LPA pourrait agir sur l'hyperplasie et non l'hypertrophie adipocytaire. Mais comme nous l'avons vu, l'hyperplasie nécessite la prolifération de préadipocytes, qui est stimulée par le LPA, et leur différenciation en adipocytes, qui elle est inhibée par le LPA.

En 2008, une étude a montré que le LPA augmentait le transport de glucose dans des adipocytes de la lignée 3T3L1, mais aussi dans des myotubes, en augmentant la translocation du transporteur Glut4 à la membrane plasmique [165]. Ceci suggère que le LPA n'est pas uniquement impliqué dans la régulation de la prolifération et de la différenciation adipocytaire mais aussi dans le métabolisme glucidique.

II. Objectifs de la première partie

Les données concernant l'ATX et le LPA dans le tissu adipeux, essentiellement acquises dans notre équipe, confirment l'importance du tissu adipeux dans ce domaine. Nous l'avons vu, le tissu adipeux est impliqué, d'une part en tant que le lieu d'expression de l'ATX et de synthèse du LPA, et d'autre part, en tant que cible, notamment par l'intermédiaire du récepteur LPA1 exprimé par la fraction stroma vasculaire et les préadipocytes. Ceci suggère l'existence d'une action locale paracrine de l'ATX et du LPA dans le tissu adipeux. *In vitro* le LPA est ainsi capable de stimuler la prolifération des préadipocytes et d'inhiber leur différenciation en préadipocytes. L'invalidation du récepteur LPA1 chez la souris soumise à un régime normal a pour effet d'augmenter sa proportion de masse grasse. De plus, l'ATX dans le tissu adipeux est surexprimée dans les situations d'obésité associée au diabète chez la souris mais aussi chez l'homme.

Cependant certaines questions restent posées. Quel mécanisme est responsable de l'augmentation de la masse grasse des animaux dépourvus de signalisation ATX/LPA ? Quels

rôles jouent l'ATX et le LPA dans la physiologie du tissu adipeux chez des animaux soumis à un régime gras obésogène ? La production d'ATX et de LPA par le tissu adipeux influence-t-elle les taux plasmatiques de LPA, et qu'en est-il en situation d'obésité ?

Afin de répondre à ces questions, deux modèles de souris transgéniques ont été utilisés. Dans le **premier article** présenté ici, nous avons utilisé un modèle murin présentant une invalidation totale du récepteur LPA1 et ayant déjà fait l'objet de plusieurs études concernant notamment des aspects développementaux [46]. La physiologie du tissu adipeux chez ces souris a été étudiée dans l'équipe depuis 2005, mais uniquement chez des animaux soumis à un régime alimentaire normal [47]. Nous avons ici soumis ces souris à un régime enrichi en graisses dans le but de générer une obésité et d'étudier les rôles du LPA dans ces conditions.

Le **deuxième article** porte sur l'étude d'un nouveau modèle murin généré durant la thèse. Nous avons réalisé une invalidation de l'ATX spécifiquement dans le tissu adipeux chez des souris qui ont, elles aussi, été soumises à un régime enrichi en graisses. Nous avons étudié sur ces souris le développement du tissu adipeux dans ces conditions obésogènes et ses conséquences physiologiques.

III. Résultats : article 1

Altered food consumption in mice lacking lysophosphatidic acid receptor-1.

Dusaulcy R, Daviaud D, Pradère JP, Grès S, Valet P, Saulnier-Blache JS.

J Physiol Biochem. 2009 Dec;65(4):345-50.

J Physiol Biochem, 65 (4), 000-000, 2009

Altered food consumption in mice lacking lysophosphatidic acid receptor-1

R. Dusauley, D. Daviaud, J-P. Pradère, S. Grès, Ph. Valet and J.S. Saulnier-Blache

Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, INSERM U858, IFR31, Université Paul Sabatier, BP 84225 F-31432 Toulouse cedex 4, France

(Received on November, 2009)

R. DUSAULCY, D. DAVIAUD, J. P. PRADÈRE, S. GRÈS, P. VALET and J.S. SAULNIER-BLACHE. *Altered food consumption in mice lacking lysophosphatidic acid receptor-1*. J Physiol Biochem, 65 (4), 000-000, 2009.

The release of lysophosphatidic acid (LPA) by adipocytes has previously been proposed to play a role in obesity and associated pathologies such as insulin resistance and diabetes. In the present work, the sensitivity to diet-induced obesity was studied in mice lacking one of the LPA receptor subtype (LPA1R). Conversely to what was observed in wild type (WT) mice, LPA1R-KO-mice fed a high fat diet (HFD) showed no significant increase in body weight or fat mass when compared to low fat diet (LFD). In addition, in contrast to what was observed in WT mice, LPA1R-KO mice did not exhibit over-consumption of food associated with HFD. Surprisingly, when fed a LFD, LPA1R-KO mice exhibited significant higher plasma leptin concentration and higher level of adipocyte leptin mRNA than WT mice. In conclusion, LPA1R-KO mice were found to be resistant to diet-induced obesity consecutive to a resistance to fat-induced over-consumption of food that may result at least in part from alterations in leptin expression and production.

Key words: Lysophosphatidic acid, Food intake, Adipose tissue, High fat diet.

Lysophosphatide acid (LPA) is a bioactive phospholipid regulating a wide range of cellular responses (proliferation, survival, motility, ion flux, secretion) via the activation of specific G-protein-coupled receptors: LPAR1 to LPAR7 (1). Invalidation of LPA1R in mice (LPA1R-KO)

leads to a reduce post-natal survival as a consequence of an abnormal suckling behaviour (2). This suggest a possible involvement of LPA in regulation of food intake.

LPA is produced in the extracellular medium of the adipocytes as the result of the hydrolysis of lysophosphatidylcholine by a secreted lyso-phospholipase D named autotaxin (ATX) (3, 4). The expression of ATX in adipose tissue is up-

Correspondence to R. Dusauley (Tel.: +33 561 325 636; Fax: +33 562 325 623; e-mail: rodolphe.dusauley@inserm.fr).

regulated in obesity associated insulin-resistance in both human and mouse (5). LPA1R is the most abundant LPA-receptor subtype expressed in adipose tissue and its activation inhibits adipocyte differentiation in culture (6). All these observations suggest that LPA could play a role in adipose tissue development as well as in obesity and/or associated pathologies such as diabetes.

The objective of the present study was to determine whether LPA could play a role in the development of diet-induced obesity (DIO).

Material and Methods

Animals.—Initial LPA1R-KO founders were generated (2) and kindly provided by Dr. Jerold Chun in 2000. These mice were on a mix 129SvJ/C57Bl6J genetic background. LPA1R-KO were backcrossed with C57Bl/6J mice over 9 generations to get a pure genetic background. Animals were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM). Mice (males) were housed conventionally in a constant temperature (20–22 °C) and humidity (50–60%) animal room and with a 12/12h light/dark cycle (lights on at 8:00 am) and free access to food and water. Animals were fed from the 4th to the 15th weeks after birth with either a low fat diet (LFD) (20% protein, 70% carbohydrate and 10% fat, Harlan, France) or a high fat diet (HFD) (20% protein, 35% carbohydrate and 45% fat, SAFE, France). Mice were sacrificed in non-fasting state. The blood was collected on heparin tubes and glucose was immediately measured with a glucose meter. Elisa kit was used to quantify plasma concentration of leptin (R&D system). Enzymatic kits were used to

quantify plasma concentration of triglycerides and glucose (Biomerieux, France) and non-esterified fatty acids (Wako). Adipose tissue was dissected out and weighed before separating the adipocytes from the stroma-vascular fraction (see below).

Isolation of adipocytes.—Adipose tissue was minced and incubated in 5 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 1 mg/ml collagenase and 1% BSA for 30 min at 37 °C under shaking. Digested tissue was filtrated through a 150-µm screen and centrifuged at 900 g for 5 minutes in order to get adipocytes in the floating fraction, and stroma-vascular cells (preadipocytes, endothelial cells and macrophages) in the pellet.

mRNA quantification.—Total RNAs were extracted from adipocytes using the RNeasy mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Total RNA (1 µg) were reverse transcribed for 60 min at 37 °C using Superscript II reverse transcriptase (Life Technology) in the presence of random hexamers. A minus RT reaction was performed in parallel to ensure the absence of genomic DNA contamination. Real time PCR was performed starting with 25 ng cDNA and 100 to 900 nM specific oligonucleotide primers in a final volume of 25 µl using the SYBR green TaqMan Universel PCR Master Mix (Applied Biosystem). Fluorescence was monitored and analyzed in a StepOnePlus Real-Time PCR system instrument (Applied Biosystems). Analysis of the 18S ribosomal RNA was performed in parallel using the Ribosomal RNA control Taqman Assay Kit (Applied Biosystem) in order to normalize the gene expression. Results are expressed as fol-

lowing: $2^{(Ct18S-Ct\text{gene})}$ where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a pre-defined threshold. Oligonucleotide primers were designed using the Primer Express software (Perkin Elmer Life Sciences).

Sequence of the oligonucleotide primer sets:

- LPA1R: sense: 5'- CATGGTG-GCAATCTACGTCAA', antisense: 5'- AGGCCAATCCAGCGAAGAA-3'
- LPA2R: sense: 5'- TGTCTGACTG-CACAGCTTGGA', antisense: 5'- CTCATGGAGTTTCTGGTGCC-3'
- leptin: sense: 5'- GGGCTTCACCC-CATTCTGA', antisense: 5'- TGGC-TATCTGCAGCACATTTTG-3'
- adiponectin: sense: 5'- TGGAAT-GACAGGAGCTGAAGG', antisense: 5'- TATAAGCGGCTTCTCCA GGCT-3'
- lipoprotein lipase: sense: 5'- TTATCC-CAATGGAGGCACTTTC', antisense: 5'- CACGTCTCCGAGTCCTCTC TCT-3'
- glut-4: sense: 5'- CCGGATTCCATC-CCACAAG', antisense: 5'- CATGC-CACCCACAGAGAAGA-3'

analysis.— Results are means \pm SE. Student's *t*-test was used to compare two groups of data.

Results

Influence on body weight and fat mass.— As expected, WT mice fed a HFD exhibited significant increase of their body weight and adipose tissue (subcutaneous and perigonadic) mass when compared to LFD (Table I). As previously reported, KO mice fed a LFD exhibited lower body weight but a higher fat mass than WT-mice fed a LFD (6). Conversely

to what was observed in WT-mice, KO-mice fed a HFD showed no significant increase of their body weight and fat mass when compared to LFD (Table I). These observations revealed a resistance of LPA1R-KO mice to diet-induced obesity.

Influence on food intake.— When fed a LFD, food consumption of LPA1R-KO mice was not significantly different from that of WT-mice (Fig. 1). WT-mice fed a HFD exhibited an over-consumption of food when compared to WT-mice fed a LFD (particularly between the 5th and the 10th week) (Fig. 1). When expressed as g/week/g body weight, the mean food intake over the whole diet period was doubled under HFD when compared to LFD (2.1 ± 0.5 vs. 1.0 ± 0.2). When fed a HFD, the over-consumption of food observed in WT mice was not observed in LPA1R-KO mice (Fig. 1). These observations revealed a specific resistance of

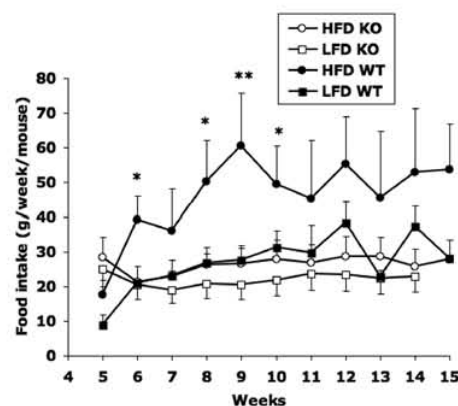


Fig. 1. Follow-up of food intake. Wild type (WT) and LPA1R-KO (KO) mice were fed a low fat diet (LFD) or a high fat diet (HFD) from the 4th to the 15th week post-weaning and food intake was weighed every week from the 5th week. Difference between LFD and HFD was analyzed using a Student's *t*-test: $P < 0.05$ *; $P < 0.01$ **. LFD KO ($n=3$), HFD KO ($n=3$), LFD WT ($n=6$), HFD WT ($n=7$).

d4

R. DUSAULCY, D. DAVIAUD, J.-P. PRADÈRE, S. GRÈS *et al.*

LPA1R-KO-mice to fat-induced over-consumption of food.

Influence on leptin.— Because leptin is known to be anorexigenic, its plasma concentration and its expression in adipocytes were analyzed. As expected, WT-mice fed a HFD exhibited a potent increase (7 fold) in plasma leptin concentration when compared to LFD (Table I). This was associated with a potent increase (3.7 fold) in adipocyte leptin mRNA (Table II). Surprisingly, under LFD plasma leptin concentration of LPA1R-KO mice was significantly higher (2.1 fold) than that of WT mice (Table I). This was associated with a higher level of adipocyte leptin and

glut-4 mRNA (Table II). In contrast, the expression of other adipocyte-genes such as adiponectin and LPL were not significantly different (Table II). In addition, and conversely to what was observed in WT-mice, HFD did not increase plasma leptin concentration (Table I) nor adipocyte-leptin mRNA level (Table II) in LPA1R-KO mice. These observations revealed that LPA1R-KO mice exhibited profound alterations of leptin expression and production.

Discussion

Invalidation of LPA1R in mice (LPA1R-KO) has been shown to reduce

Table I. Weight and plasma parameters in wild type (WT) and LPA1R-KO (KO) mice fed low and high fat diet.

	WT		KO	
	LFD (n=8)	HFD (n=12)	LFD (n=5)	HFD (n=12)
Body weight (g)	32.2 ± 0.09	37.9 ± 1.4 **	29.1 ± 0.5	29.4 ± 0.9
PG weight (g)	0.34 ± 0.06	1.02 ± 0.19 **	0.51 ± 0.05 \$	0.52 ± 0.06
SC weight (g)	0.21 ± 0.04	0.52 ± 0.09 **	0.27 ± 0.03	0.27 ± 0.02
BAT weight (g)	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.02 *	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
TG (g/l)	0.36 ± 0.03	0.44 ± 0.05	0.31 ± 0.03	0.34 ± 0.03
FFA (nM)	0.65 ± 0.06	0.72 ± 0.04	0.77 ± 0.06	0.65 ± 0.06
Glucose (g/l)	1.73 ± 0.13	2.25 ± 0.19 *	2.02 ± 0.15 \$	1.81 ± 0.51
Leptin (ng/ml)	2.2 ± 0.2	14.2 ± 3.8 **	4.6 ± 0.8 \$\$	3.6 ± 0.5

Student's *t*-test was used to compare : LFD vs. HFD ($P < 0.05$ * ; $P < 0.01$ **) and WT LFD vs. KO LFD ($P < 0.05$ \$; $P < 0.01$ \$\$).

Table II. Adipocyte gene expression.

mRNA / 18S RNA (x10000)	WT		KO	
	LFD (n=3)	HFD (n=3)	LFD (n=3)	HFD (n=3)
LPA1R	10 ± 2	19 ± 4*	und	und
LPA2R	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.8	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.5
adiponectin	109 ± 18	17 ± 5	135 ± 7	127 ± 15
lipoprotein lipase	2106 ± 147	2224 ± 786	2858 ± 542	2833 ± 554
GLUT-4	86 ± 13	67 ± 12	151 ± 19\$	123 ± 40
leptin	512 ± 56	1913 ± 131**	1929 ± 472\$\$	995 ± 159**

Und : undetectable. Student's *t*-test was used to compare : LFD vs. HFD ($P < 0.05$ * ; $P < 0.01$ **) and WT LFD vs KO LFD ($P < 0.05$ \$; $P < 0.01$ \$\$).

neonate survival. Adult LPA1R-KO survivors also reveal growth alterations with about 30% reduction of their total body weight (2). The decrease in post-natal growth was proposed to result from an abnormal suckling behavior of the pups likely resulting from a lack of olfactant detection and/or processing (2). Whereas growth alteration of the adult survivors is reflecting decreased postnatal growth rate, one cannot exclude that LPA1R invalidation could influence feeding behavior in adults.

Our data show that when fed a LFD, the food consumption of LPA1R-KO mice was not altered. Likewise, when fed a HFD, LPA1R-KO mice did not exhibit the increase of food intake that was observed in WT-mice. The consequence of this alteration in food intake is that LPA1R-KO mice exhibited no increase in fat mass. These observations suggest that LPA1-receptor is not essential for the maintenance of low fat food intake but does modulates high-fat food intake. This conclusion is in agreement with a recent report showing that transgenic-mediated increase in plasma LPA in mice increases HFD-induced weight gain partly explained by increased in food intake (7).

One possible explanation of the alteration of feeding behavior of LPA1R-KO mice could come from the alteration of leptin expression and production. In particular, we observed that under LFD, LPA1R-KO mice exhibited higher adipocyte leptin expression and higher plasma level. Because of the anorexigenic activity of leptin, one could hypothesize that its higher level in LPA1R-KO mice could explain their resistance to high fat feeding. One important perspective of the present work is to delineate the mechanism responsible of the higher leptin expression in LPA1R-KO mice in LFD. Leptin expression is related to fat mass

accretion. As we previously reported (6) and as also observed in the present study, LPA1R-KO mice under LFD exhibit higher perigonadic fat mass with larger adipocytes than WT-mice. In addition, LPA being produced by adipocytes themselves, a direct regulation of leptin expression by LPA cannot be excluded.

Because of the complexity of LPA-receptor gene regulation and tissue distribution, more selective and targeted approaches will be necessary to fully understand the underlying mechanisms involved in LPA-dependent regulation of food intake and energy storage.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the INSERM. R. Dusaucy was supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (France). We would like to thank Dr. Jerold Chun for having provided initial LPA1R(-/-) founders, V. Abello for spanish translation, careful reading of the manuscript and helpful comments.

References

1. Noguchi, K., Herr, D., Mutoh, T., Chun, J. (2009): Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol*, **9**, 15-23.
2. Contos, J.J., Fukushima, N., Weiner, J.A., Kaushal, D., Chun, J. (2000): Requirement for the LPA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13384-13389.
3. Gesta, S., Simon, M.F., Rey, A., Sibrac, D., Girard, A., Lafontan, M., Valet, P., Saulnier-Blache, J.S. (2002): Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *J Lipid Res*, **43**, 904-910.
4. Ferry, G., Tellier, E., Try, A., Grés, S., Naime, I., Simon, M.F., Rodríguez, M., Boucher, J., Tack, I., Gesta, S., Chomarat, P., Dieu, M., Raes, M., Galizzi, J.P., Valet, P., Boutin, J.A., Saulnier-Blache, J.S. (2003): Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation: up-regulated expression with adipocyte differen-

- tiation and obesity. *J Biol Chem*, **278**, 18162-18179.
5. Boucher, J., Quilliot, D., Pradère, JP., Simon, MF., Grès, S., Guigné, C., Prévot, D., Ferry, G., Boutin, J.A., Carpené, C., Valet, P., Saulnier-Blache JS. (2005): Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia*, **48**, 569-577.
6. Simon, MF., Daviaud, D., Pradère, JP., Grès, S., Guigné, C., Wabitsch, M., Chun, J., Valet, P., Saulnier-Blache, JS. (2005): Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *J Biol Chem*, **280**, 14656-14662.
7. Federico, L., Liu, S., Muller, P., Mills, G.B., Morris, A.J., Smyth, S.S. (2009): Autotaxin/lysophosphatidic acid axis: *in vivo* evidence for a role in obesity predisposition. *J Thromb Haemost*, **7**, Suppl. 2: Abstract PP-TH-392.

IV. Discussion article 1

L'objectif initial de cette étude était de déterminer le rôle joué par le couple ATX/LPA dans le développement d'une obésité d'origine nutritionnelle. Pour cela des souris invalidées pour le récepteur LPA1 ont été soumises à un régime gras. Cependant, contrairement aux résultats attendus, le régime gras n'a pas entraîné de prise de poids chez les souris invalidées. Alors que la consommation alimentaire des souris sauvages est augmentée, celle des souris invalidées pour le récepteur LPA1 demeure inchangée sous régime gras. Le modèle de souris utilisé repose sur une invalidation totale du récepteur LPA1.

Ce récepteur étant fortement exprimé dans le système nerveux central (siège du contrôle de la prise alimentaire), il est possible que le LPA soit un acteur de la régulation de la prise alimentaire au niveau central. Il serait intéressant d'étudier l'influence du LPA sur l'expression ou la signalisation de facteurs tels que le neuropeptide Y ou la pro-opiomélanocortine. Par ailleurs le LPA pourrait être impliqué dans les modifications engendrées au niveau du système nerveux central qui sont responsables de l'augmentation de la prise alimentaire lorsque des souris sont soumises à un régime gras.

L'action du LPA sur la prise alimentaire peut aussi être indirecte et impliquer l'effet anorexigène de la leptine produite par le tissu adipeux. Les forts taux de leptine observés chez les souris invalidées pour le récepteur LPA1 pourraient être dus à une inhibition de l'expression de la leptine par le LPA qui serait levée en l'absence du récepteur. Cependant cette hypothèse est peu probable car la leptine est produite par les adipocytes alors que la cible du LPA, via le récepteur LPA1, est le préadipocyte. Nous pouvons aussi envisager que la forte expression de la leptine soit le reflet d'une hypertrophie adipocytaire chez les souris invalidées pour le récepteur LPA1. Le LPA stimulant la prolifération et inhibant la différenciation des préadipocytes, il est possible que le tissu adipeux des souris invalidées pour le récepteur LPA1 ne se développe qu'à partir d'un stock limité de préadipocytes hypersensibles à la différenciation. Ceci conduirait à la formation d'un tissu adipeux dont l'expansion serait limitée et ne se ferait que par hypertrophie adipocytaire. Le tissu adipeux hypertrophique surexprimerait la leptine qui inhiberait elle-même la prise alimentaire.

Cependant, d'autres résultats obtenus dans l'équipe montrent qu'il est possible de générer chez ces souris invalidées pour le récepteur LPA1 une prise de poids en altérant de façon chimique par un traitement à l'aurothiogluucose les centres hypothalamiques de la satiété. Ce traitement rend les souris hyperphagiques, permettant ainsi de s'affranchir des modifications comportementales dues à l'absence de récepteur LPA1. L'augmentation de la masse des

dépôts adipeux est supérieure chez les souris invalidées pour le récepteur LPA1 comparativement aux souris sauvages. Les mécanismes permettant le développement du tissu adipeux chez ces souris n'ont toutefois pas été élucidés [166].

Le modèle d'invalidation du récepteur LPA1 que nous avons utilisé ici ne nous permet pas de répondre à nos objectifs initiaux, c'est-à-dire de déterminer le rôle de la signalisation ATX/LPA du tissu adipeux dans le développement de l'obésité d'origine nutritionnelle. Afin de répondre à ces questions, nous avons décidé d'utiliser une approche transgénique ciblant le tissu adipeux afin de nous affranchir des effets de l'ATX et du LPA sur les autres organes. L'invalidation du récepteur LPA1 spécifiquement dans le tissu adipeux aurait nécessité de cibler les préadipocytes, mais cette approche ne peut être réalisée à ce jour du fait de l'absence de promoteur spécifique connu de ces cellules. Nous avons donc généré des souris invalidées spécifiquement pour le gène de l'ATX dans les adipocytes grâce à l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur aP2. Ces souris ont été soumises à un régime gras afin d'étudier le rôle de l'ATX au cours de l'obésité (article 2).

V. Résultats : article 2

Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid.

Dusaulcy R, Rancoule C, Grès S, Wanecq E, Colom A, Guigné C, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Valet P, Saulnier-Blache JS.
J Lipid Res. 2011 Jun;52(6):1247-55.

Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid

Rodolphe Dusaucy,^{*,†} Chloé Rancoule,^{*,†} Sandra Grès,^{*,†} Estelle Wanecq,^{*,†} André Colom,^{*,†} Charlotte Guigné,^{*,†} Laurens A. van Meeteren,[§] Wouter H. Moolenaar,[§] Philippe Valet,^{*,†} and Jean Sébastien Saulnier-Blache^{1,*,†}

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048,* Toulouse, Cedex 4, France; Université de Toulouse, UPS, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil,[†] IFR150, BP84225, Toulouse, France; and Division of Cell Biology and Center for Biomedical Genetics,[§] The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands

Abstract Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D that generates the lipid mediator lysophosphatidic acid (LPA). ATX is secreted by adipose tissue and its expression is enhanced in obese/insulin-resistant individuals. Here, we analyzed the specific contribution of adipose-ATX to fat expansion associated with nutritional obesity and its consequences on plasma LPA levels. We established ATX^{fl/fl}/aP2-Cre (FATX-KO) transgenic mice carrying a null ATX allele specifically in adipose tissue. FATX-KO mice and their control littermates were fed either a normal or a high-fat diet (HFD) (45% fat) for 13 weeks. FATX-KO mice showed a strong decrease (up to 90%) in ATX expression in white and brown adipose tissue, but not in other ATX-expressing organs. This was associated with a 38% reduction in plasma LPA levels. When fed an HFD, FATX-KO mice showed a higher fat mass and a higher adipocyte size than control mice although food intake was unchanged. This was associated with increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2 and of PPAR-sensitive genes (aP2, adiponectin, leptin, glut-1) in subcutaneous white adipose tissue, as well as in an increased tolerance to glucose. These results show that adipose-ATX is a negative regulator of fat mass expansion in response to an HFD and contributes to plasma LPA levels.—Dusaucy, R., C. Rancoule, S. Grès, E. Wanecq, A. Colom, C. Guigné, L. A. van Meeteren, W. H. Moolenaar, P. Valet, and J. S. Saulnier-Blache. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J. Lipid Res.* 2011. 52: 1247–1255.

Supplementary key words adipocyte • high-fat diet • obesity

This work was supported by grants from the INSERM, the Fondation pour la Recherche Médicale (grant # DRM20101220459), and the Dutch Cancer Society. R. Dusaucy and C. Rancoule were supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (France).

Manuscript received 23 February 2011.

Published, JLR Papers in Press, March 18, 2011.

DOI 10.1194/jlr.M014985

Copyright © 2011 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D that catalyzes the hydrolysis of lysophosphatidylcholine into lysophosphatidic acid (LPA), a growth factor-like lipid mediator acting via specific G-protein coupled receptors (1–3). ATX is present in plasma and other biological fluids and is expressed by several organs and tissues but the tissue origin of circulating LPA remains unknown. ATX plays a crucial role in embryonic development because its knock-out in mice is lethal due to impaired blood vessel formation and a failure of neural tube closure (4–6).

So far, ATX has mostly been studied for its role in tumorigenesis, angiogenesis, and metastasis (7). Our group has brought ATX into the area of metabolic diseases. We have shown that ATX is abundantly expressed and secreted by adipocytes (8–10) and is responsible for the production of LPA in adipose tissue extracellular medium (11). Nevertheless, the specific contribution of adipose-ATX to circulating LPA remains unknown. ATX expression is increased in adipose tissue from obese/insulin-resistant mice and humans (9, 12). In vitro, ATX expression and secretion increase during the differentiation of preadipocytes into adipocytes (adipogenesis) (8, 9). These observations suggested that ATX contributes to fat development in obesity and associated pathologies. In the present study, we set out to disrupt ATX expression specifically in mouse adipose tissue to examine whether fat mass and plasma LPA concentration were affected. We demonstrate that adipocyte-specific disruption of ATX significantly increases the sensitivity of adipose tissue to expand in response to a high-fat diet (HFD) and directly influences plasma LPA levels.

Abbreviations: ATX, autotaxin; FATX-KO, ATX^{fl/fl}/aP2-Cre; HFD, high-fat diet; LPA, lysophosphatidic acid; ND, normal diet; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.

¹To whom correspondence should be addressed.

e-mail: Jean-Sebastien.Saulnier-Blache@inserm.fr

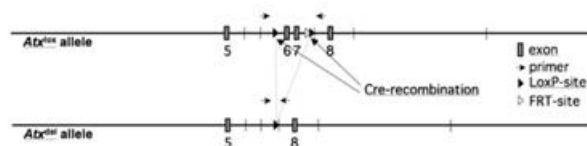


Fig. 1. Schematic representation of Cre-mediated recombination of the floxed-ATX gene. Adapted from (4).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Animals were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and were in conformity with the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. The local Animal facility committee of INSERM approved our protocols. Mice were housed conventionally under a constant temperature (20–22°C) and humidity (50–60%) and with a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) and free access to food and water. The animals were fed either a normal diet (ND) [2900 kcal/kg; 16% protein, 81% carbohydrate, and 3% fat (SAFE, Augy, France)] or an HFD [4730 kcal/kg; 20% protein, 35% carbohydrate, and 45% fat (Research Diet, France)]. When the HFD was applied, it started at the age of 10 weeks for 13 weeks. Fat and lean mass was measured using dual-energy X-ray absorptiometry (EchoMRI-100TM, Echo Medical System, Houston, TX) in accordance with the manufacturer's instructions.

Establishment of $ATX^{F/F}$ /aP2-Cre mice

$ATX^{F/F}$ (FVB genetic background) mice carrying a conditional ATX deleted allele in which exons 6 and 7 (encoding for the catalytic site of ATX) are flanked by two loxP sites were previously described (4). aP2-Cre mice (B6 genetic background) (Jackson Laboratory) carry a Cre transgene driven by promoter sequences from the fatty acid binding protein 4, a gene predominantly expressed in adipocytes (13). $ATX^{F/F}$ mice were mated to aP2-Cre mice and offspring were genotyped in order to select mice bearing both $ATX^{F/F}$ and aP2-Cre alleles (Fig. 1). $ATX^{F/F}$ /aP2-Cre ($FATX$ -KO) mice were compared with control $ATX^{F/F}$ littermates of the same generation.

Genotyping

Genotyping was performed by PCR on tail-tip DNA. The presence of the $ATX^{F/F}$ allele was determined by using the primers P583 (5'-TGCTTGAAGTGTGTGCAC-3') and P584 (5'-TTGAATCTGAGCAATATGG-3') yielding 170 bp and 300 bp products for the wild-type and the floxed alleles, respectively (Fig. 1). Cycling conditions were: 34 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s.

The presence of the aP2-Cre allele was determined using the primers C001 (5'-ACCAGCCAGCTATCAACTCG-3') and C002 (5'-TTACATTGGTCCAGCCACC-3') yielding a 192 bp product. An internal PCR control targeting interleukin-2 gene was performed with primers C003 (5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3') and C004 (5'-GTAGGTGGAAATCTAGCATCATCC-3') yielding a 324 bp product. Cycling conditions were: 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 2 min, and 72°C for 1 min.

Adipose cell fractionation

Immediately after dissection, adipose tissue was minced and incubated for 30 min at 37°C under shaking in 5 ml of Krebs-Ringer buffer supplemented with 1 mg/ml collagenase, 3.5 g/100 ml bovine serum albumin, and 22 mg/100 ml pyruvate. Digested tissue was filtered through a 150 μ m screen and floating adipocytes were separated from infranatant, which was centrifuged at 900 g for 20 min in order to get stroma-vascular cells (preadipocytes, endothelial cells, and macrophages) in the pellet.

mRNA quantification

Total RNAs were extracted from tissues and cells using the RNeasy mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed for 60 min at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of random hexamers. A minus RT reaction was performed in parallel

TABLE 1. Sequence of the oligonucleotide primer sets used in RT-PCR analysis

Target genes	Primer sequence 5' to 3'	
	Sense	Antisense
ATX 6-7	TCCGTGCATCGTACATGAAGA	CAGGACCGCAGTTTCTCAATG
ATX 1-2	TGTTTCGGGTGATACACAGGTAAT	TGCACTTGCTGTGAATCCTAAGC
PPAR γ 2	CTGTTTATGCTGTATAGGGTGAA	GCACCATGCTCTGGGTCAA
FABP4 (aP2)	TTCGATGAAATCACGCGAGA	GGTCCGACTTCCATCCACIT
CD11b	TCCGACGAGTTCGGGATTC	TGTGATCTTGGGCTAGGGTTTC
F4/80	TGACAACGAGACGGCTTGTG	GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT
CD31	GTCGTCCATGTCCGAGAA	GCACAGGACTCTCGCAATCC
Adiponectin	TGGAATGACAGGAGCTGAAGG	TATAAGCGGGTTCTCCAGGCT
Leptin	GGGCTTCACCCGATTCTGA	TGGCTATCTGCAGCACATTTTG
Glut-1	GGGTGTGACGAGCCTGTGT	CACAGTGAAGGCCGTGTGTA
Glut-4	CCGGATTCCATCCACAAG	CATGCCACCCACAGAGAAGA
LPL	TTATCCGAATGGAGGCATTTTC	CACGTGTCGGAGTCTCTGCT
FAS	ATCTCGGAACGAGAACGATCT	AGAGACGTGTCACTCTGGACTT
UCP1	GCTGCTCTCTCGGAACAA	TGTAGGCTGCCCAATGAACA
CD45	ACATGCTGCCAATGGTTCTG	TGCCACATGACTGCTTCTCATG
PGC1 α	AAAGGATGCCGTCTCGTTCA	GGAATATGGTGATCGGGAAACA

ATX, autotaxin; PPAR, peroxisome proliferator activated receptor; FABP, fatty acid binding protein; CD, cluster of differentiation molecule; F4/80, EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1; Glut, glucose transporter; LPL, lipoprotein lipase; FAS, fatty acid synthase; UCP, uncoupling protein; PGC, peroxisome proliferator-activated receptor γ , coactivator.

to ensure the absence of genomic DNA contamination. Real-time PCR was performed starting with 12.5 ng cDNA and 100 to 900 nM specific oligonucleotide primers in a final volume of 20 μ l using the Mesa blue QPCR Master Mix for Sybr (Eurogentec). Fluorescence was monitored and analyzed in a StepOnePlus Real-Time PCR system instrument (Applied Biosystems). Analysis of the 18S rRNA was performed in parallel using the RRNA

control Taqman Assay Kit (Applied Biosystem) in order to normalize gene expression levels. Results are expressed as follows: $2^{-(Ct^{(18S-CT)} - Ct^{(ATX)})}$ where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. Oligonucleotide primers were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems). The sequence of the oligonucleotide primers is listed in Table 1.

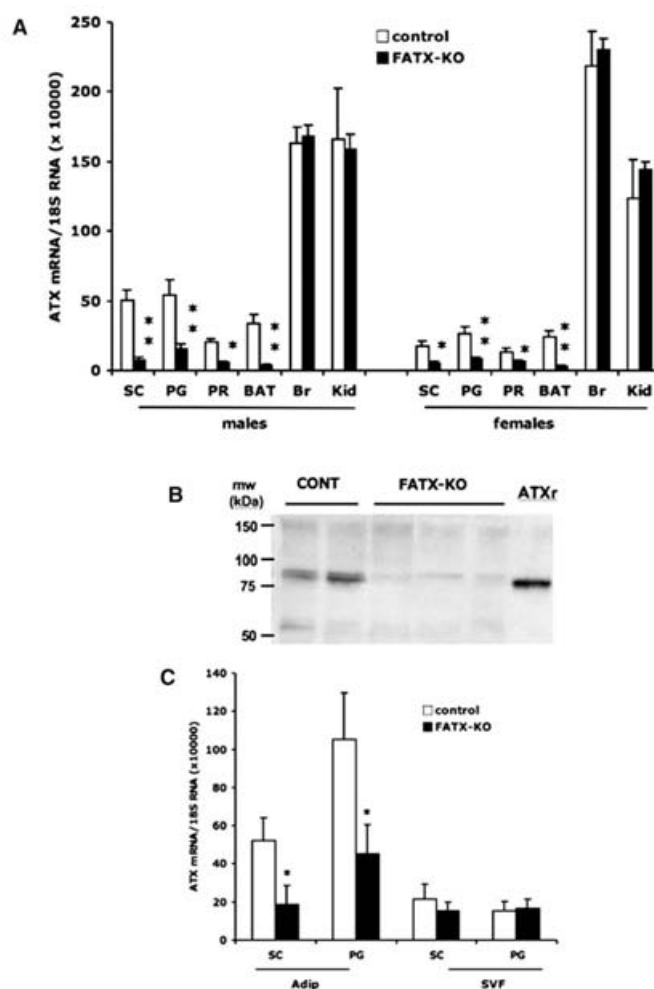


Fig. 2. Adipose-specific disruption of ATX. A: ATX mRNAs were quantified in subcutaneous (SC), perigonadal (PG), perirenal (PR) white adipose tissue, brown adipose tissue (BAT), brain, and kidney from control (8 males, 4 females) and FATX-KO (14 males, 17 females) mice fed a normal diet. Values are means \pm SEM. B: ATX protein was detected by Western blot in subcutaneous white adipose tissue from 23 weeks old control (CONT, $n = 2$) and FATX-KO ($n = 3$) male mice. Recombinant mouse ATX (ATXr) expressed in Sf9-cells was used in parallel as a control. C: ATX mRNAs were quantified in the adipocyte (Adip) and the stroma-vascular (SVF) fractions isolated from the SC and PG white adipose tissue of control ($n = 3$) and FATX-KO ($n = 4$) male mice fed a normal diet. Values are means \pm SEM. A Student's t -test was used to compare control with FATX-KO mice; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Western blot analysis

Thirty micrograms of protein from concentrated conditioned medium were separated on a Gel CRITERION 4-12% (BioRad) and transferred on nitrocellulose membrane. The blot was preincubated for 1 h at room temperature in TBS/Tween 0.1% containing 5% dry milk and overnight at 4°C in the same solution supplemented with 0.7 µg/ml ATX-antibody. After washing in PBS/Tween 0.1%, ATX was visualized by enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham Biosciences) using an anti rabbit-HRP antibody (SIGMA). ATX-peptide (573-KNKLEELNKRLHT-KGS-588) antibody was purchased from Cayman Chemical.

Adipocyte cellularity measurement

Immediately after dissection, perigonadal and subcutaneous fat pads were fixed in ethanol 95% for 48 h, embedded in paraffin, and prepared on hematoxylin and eosin stained slides. Three nonoverlapping fields (300 to 1500 adipocytes) were captured with an analogic camera (Nikon DXM1200F) connected to a microscope (Nikon Eclipse TE2000-U). Adipocytes areas were measured with Lucia G software (Laboratory Imaging) and theoretical mean diameter was determined as $2\sqrt{\text{area}/\pi}$. Adipocyte number per fat pad was determined as previously described (14) using the following formula: $\text{FPW} \times 10^9 / [(4 \times \pi R^3/3)/1000] \times 0.95$ with FPW (fat pad weight) in mg and R (radius) in µm.

Glucose tolerance test

Blood glucose concentrations were monitored with a glucose meter (Roche Diagnostic, Grenoble, France) at -30, 0, 30, 60, 90, and 120 min after gavage of fasting mice (6 h) with glucose (3 g/kg body weight).

Quantification of plasma LPA

LPA was quantified using a radioenzymatic assay as previously described (15). Briefly, lipids were extracted from conditioned media or plasma with an equal volume of 1-butanol and evaporated. Extracted lipids were converted into [^{14}C] PA with recombinant LPA acyl-transferase in the presence of [^{14}C] oleoyl-CoA. The products of the reaction were extracted, separated by one-dimensional TLC, and autoradiographed.

Statistics

Results are means \pm SE. Student's *t*-test was used to compare two groups of data.

RESULTS

Adipose-specific disruption of ATX

ATX mRNAs were quantified using a set of oligonucleotide primers directed against exons 6 and 7, which are

expected to be deleted after Cre-mediated recombination. When compared with their control littermates, FATX-KO mice exhibited a strong reduction (70 to 90% depending on fat depot) in ATX mRNA in perigonadal, subcutaneous, and perirenal white adipose tissue as well as in brown fat tissue (Fig. 2A). No significant change in ATX mRNA was observed in brain and kidney (Fig. 2A). Similar results were obtained in both males and females (Fig. 2A). Adipose-specific disruption of ATX mRNA was also observed when using another set of PCR primers directed against exons 1 and 2, which are out of the lox site framing (not shown), suggesting that cre-mediated recombination of exons 6 and 7 led to the complete loss of the whole ATX mRNA. This was confirmed using Western blot analysis that revealed a strong reduction in the amount of ATX protein in white adipose tissue of FATX-KO mice when compared with control mice (Fig. 2B). In white adipose tissue from control mice, ATX mRNA expression was higher in the adipocyte than in the stroma-vascular fraction (Fig. 2C). In FATX-KO mice, the disruption of ATX expression was observed in the adipocyte but not in the stroma-vascular fraction when compared with control mice (Fig. 2C). These results demonstrated that in FATX-KO mice possessed an adipocyte-specific disruption of ATX expression.

Adipose-specific disruption of ATX enhances white adipose tissue expansion in response to HFD

Under ND, FATX-KO mice (males and females) showed no significant change in body weight, adipose tissue (white and brown) mass, or in the weight of other organs (liver, kidney, heart, brain, and skeletal muscles) when compared with control mice (not shown). These results show that under ND, adipose-specific disruption of ATX does not affect the normal development of white and brown adipose tissue.

Under HFD, total body weight and the weight of other organs remained unchanged between control and FATX-KO males (Table 2 and Fig. 3A). In females, a tendency of increase ($P = 0.076$) in total body weight was observed in FATX-KO when compared with control mice (Table 2). In parallel, a significantly higher weight of the three white adipose tissue depots as well as of brown adipose tissue was observed in FATX-KO when compared with control mice (Fig. 3A). This phenotype was particularly pronounced in females, (Fig. 3A). Analysis of body composition using

TABLE 2. Body weight and glycemia

			n	Body weight (g)	Plasma glucose (g/l)
Females	Normal diet	control	4	29.8 \pm 2.5	0.85 \pm 0.07
		FATX-KO	19	27.4 \pm 1.9	1.03 \pm 0.03
	High-fat diet	control	7	30.7 \pm 2.4	1.14 \pm 0.11
		FATX-KO	16	36.1 \pm 2.9 ^(0.076)	1.27 \pm 0.07
Males	Normal diet	control	8	32.3 \pm 1.7	1.28 \pm 0.16
		FATX-KO	14	34.2 \pm 1.8	1.05 \pm 0.07
	High-fat diet	control	6	45.2 \pm 2.9	1.43 \pm 0.13
		FATX-KO	15	47.6 \pm 1.9	1.54 \pm 0.13

Plasma glucose was determined after overnight fasting (*P*-value).

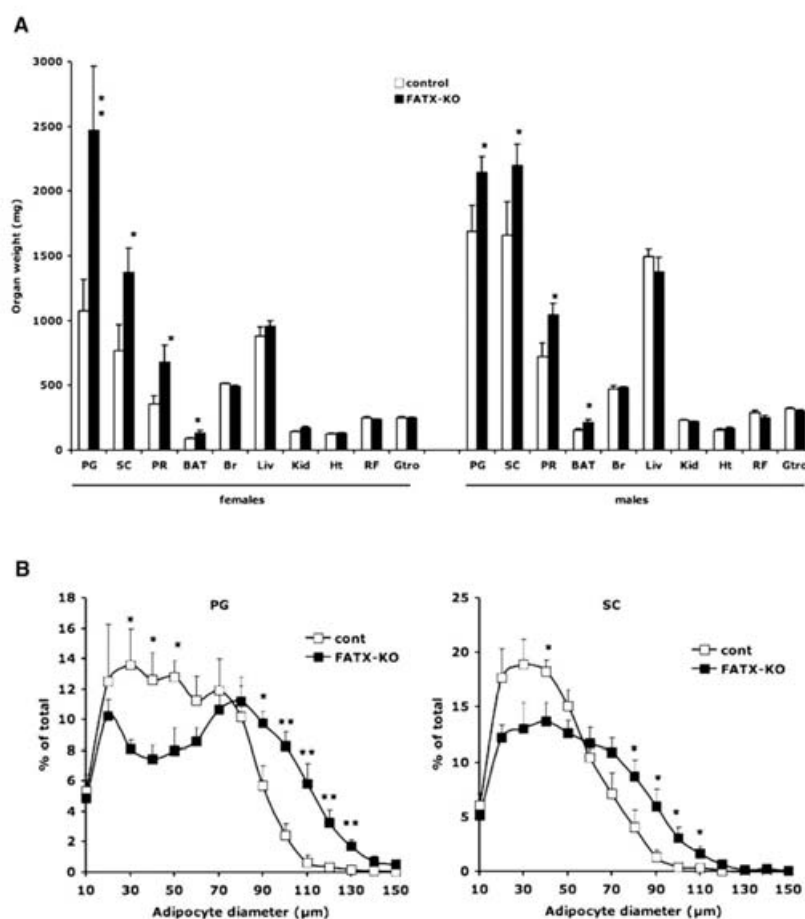


Fig. 3. Adipose-specific disruption of ATX enhances white adipose tissue mass in response to a high-fat diet (HFD). A: Control (white bars; 14 males and 19 females) and FATX-KO (black bars; 15 males and 19 females) mice were fed an HFD and their organs were weighed. PG, perigonadal adipose tissue; SC, subcutaneous adipose tissue; PR, perirenal adipose tissue; BAT, brown adipose tissue; Br, brain; Liv, liver; Kid, kidney; Ht, heart; RF, rectus femoris muscle; Gtro, gastrocnemius muscle. B: Adipocyte size distribution was analyzed in PG and SC from control ($n = 5$) and FATX-KO ($n = 6$) female mice fed an HFD. Values are means \pm SEM. A Student's t -test was used for comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

EchoMRI showed that on a HFD, FATX-KO females ($n = 4$) exhibited a significantly higher body fat mass than control females ($n = 4$) (42.1 ± 1.5 vs. $35.7 \pm 2.1\%$, $P < 0.05$) with no significant change in body lean mass (47.0 ± 1.2 vs. $51.8 \pm 2.1\%$). Adipocytes from female FATX-KO mice ($n = 5$) exhibited a higher mean size when compared with control mice ($n = 6$): 66 ± 6 versus 51 ± 4 μm in perigonadal fat ($P = 0.017$); 52 ± 3 versus 41 ± 3 μm in subcutaneous fat ($P = 0.039$). In parallel, no significant difference in adipocyte number (million per fat pad) was noticed between control and FATX-KO mice: 23 ± 5 versus 26 ± 3 for perigonadal adipose tissue; 23 ± 2 versus 24 ± 2 for subcutaneous adipose tissue. Analysis of adipocyte size distribution

showed that FATX-KO mice exhibited a significantly higher proportion of the large adipocytes (higher than 80 and 70 μm in perigonadal and subcutaneous fat pads, respectively) associated with a lower proportion of small adipocytes (lower than 70 and 60 μm in perigonadal and subcutaneous fat pads, respectively) than control mice (Fig. 3B). These results show that adipose-specific disruption of ATX enhances the sensitivity of adipose tissue to expand in response to HFD as the consequence of an hypertrophy rather than an hyperplasia of the adipocytes.

The difference in adipose tissue expansion between control and FATX-KO mice fed an HFD was associated with no significant change in cumulative food intake: $9.5 \pm$



0.4 and 9.9 ± 0.4 g/week/g body weight for control ($n = 8$) and FATX-KO ($n = 10$) female mice, respectively. It thus appears that adipose-specific disruption of ATX has no influence on food intake, suggesting that a possible impact of ATX energy expenditure has to be considered in the future.

FATX-KO mice on an HFD showed no significant difference in fasting blood glucose when compared with control mice (Table 2). Nevertheless, the amplitude of the glycemic response curve obtained after an oral ingestion of glucose was attenuated in FATX-KO female when compared with control mice (Fig. 4). This attenuation was significant as attested by a significant reduction of the area under the curve: 297 ± 23 versus 411 ± 34 arbitrary unit ($P = 0.012$) in FATX-KO and control mice, respectively. These results indicate the higher sensitivity of FATX-KO mice to expand fat mass, in response to HFD, is associated with a better glucose tolerance.

Adipose-specific disruption of ATX alters gene expression profile in subcutaneous white fat depot

To characterize the influence of ATX disruption on adipose tissue in further detail, we analyzed gene expression in white and brown adipose tissue. Because enhanced sensitivity of FATX-KOs to expand their white adipose tissue in response to an HFD was more pronounced in females than in males, we focused our analysis on females. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2, aP2, F4/80, adiponectin, leptin and Glut-1 genes was significantly higher in subcutaneous fat from FATX-KO than in control females. This was observed on both ND and HFD conditions (Fig. 5A, B). Immunohistomorphology of subcutaneous fat section revealed no detectable crown-like structure in either control and FATX-KO mice (not shown). In contrast to subcutaneous fat, no significant change in gene expression was observed in perigonadal adipose tissue between FATX-KO and control mice (Fig. 5 A and B). In brown adipose tissue, no significant change in gene expression was observed except for leptin, expression of which was higher in FATX-KO when compared with control mice in agreement with the higher brown adipose tissue mass (Fig. 3A). These results show that adipose tissue-specific disruption of ATX leads to a depot-specific alteration in gene expression profile, particularly in subcutaneous white adipose tissue.

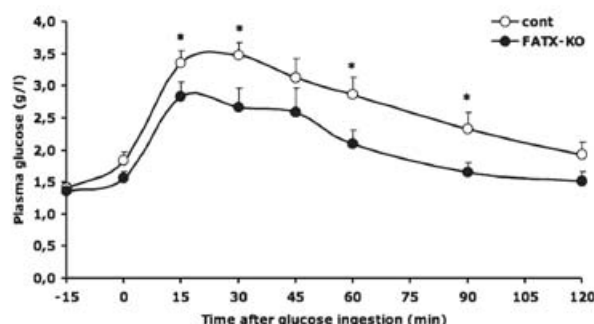


Fig. 4. Adipose-specific disruption of ATX improves glucose tolerance. Control ($n = 8$) and FATX-KO ($n = 7$) female mice were fed an HFD. Plasma glucose concentration was determined before and at different time points after an oral ingestion of a single dose of glucose. Areas under the curve were 411 ± 34 versus 297 ± 23 arbitrary unit ($P = 0.012$) in control and FATX-KO mice, respectively. A Student's *t*-test was used for comparison: * $P < 0.05$.

White adipose tissue ATX contributes to plasma LPA

On an ND, FATX-KO mice showed a significant reduction (38%) in plasma LPA when compared with control mice (Fig. 6A). On an HFD, plasma LPA concentration was increased (62%) in control mice when compared with ND. In contrast, in FATX-KO mice, an HFD had no influence on plasma LPA concentration (Fig. 6A). HFD was associated with an increased expression of ATX mRNA in perigonadal and subcutaneous white adipose tissue of control mice, not in FATX-KO mice (Fig. 6B). Interestingly, the induction of ATX expression by an HFD was stronger in subcutaneous (3.5-fold) than in perigonadal (2.4-fold) fat depots. As a result, in control mice on an HFD, subcutaneous fat produced more (1.6-fold) LPA than by perigonadal fat (8.8 ± 1.2 vs. 5.2 ± 0.5 pmoles LPA/50 mg/6 h, $n = 5$; $P < 0.023$, paired *t*-test). HFD-mediated regulation of ATX was not observed in brown adipose tissue, brain, nor kidney (Fig. 6B). We concluded that white adipose tissue ATX expression significantly influences plasma LPA levels.

DISCUSSION

Our previous studies showed that some forms of obesity in mouse and human are associated with an upregulation of ATX that is mainly restricted to adipose tissue (9, 12). Therefore, the main objective of the present study was to determine the specific contribution of adipose tissue ATX in the development of obesity. To address this, we generated transgenic mice bearing an adipose-specific invalidation of ATX (FATX-KO mice) by using a tissue-specific Cre-lox approach, and we compared their ability to develop nutritional obesity with control littermates. The chosen Cre-lox strategy was based on the predominant cre-recombinase activity in adipose tissue driven by the aP2-promoter (16). Our strategy was successful because a potent disruption of ATX was obtained in white and brown adipose tissue but not in other ATX-expressing organs. In addition, we observed that, in white adipose tissue from FATX-KO mice, the disruption of ATX was restricted to adipocytes and was not observed in the stroma-vascular fraction that also expresses ATX. This is in agreement with the predominant driving activity of the aP2-promoter in

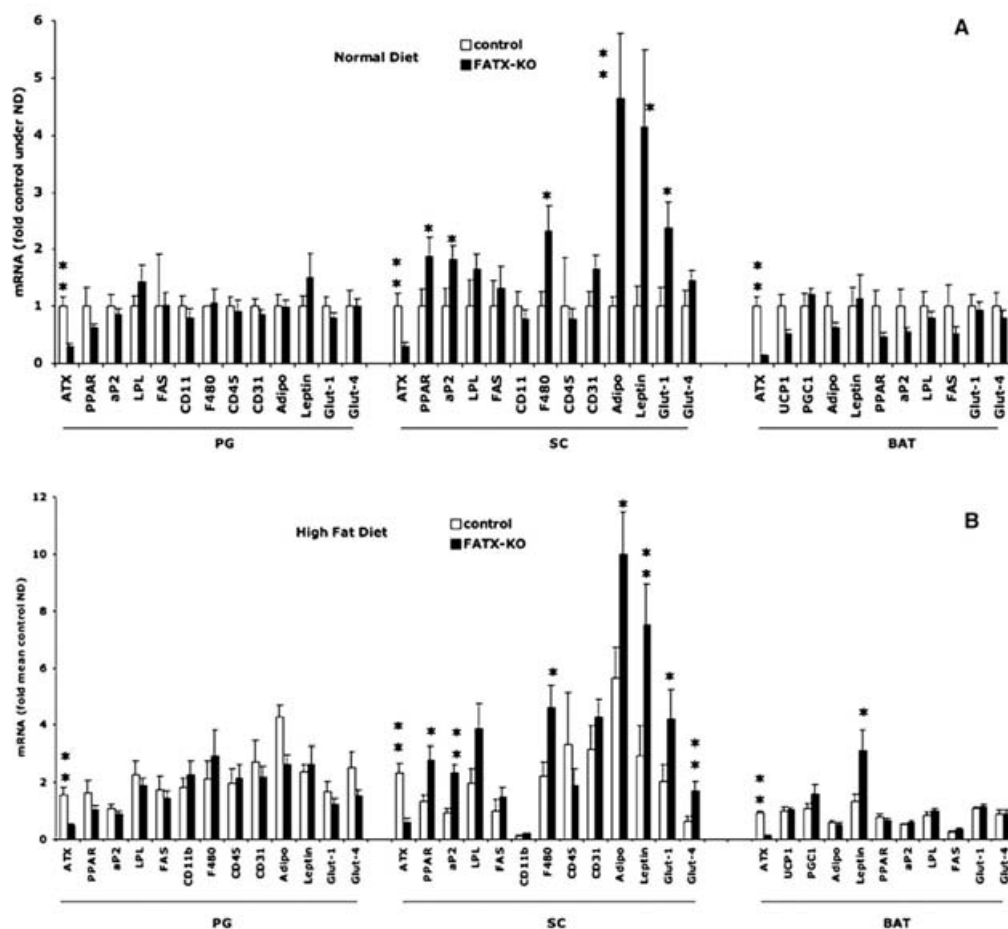


Fig. 5. Adipose-specific disruption of ATX alters gene expression in subcutaneous adipose tissue. Control and FATX-KO mice were fed either a normal diet (ND) (A) or a high-fat diet (HFD) (B) and gene expression was analyzed by real time PCR in perigonadal (PG), subcutaneous (SC), and brown adipose tissue (BAT). Values are means \pm SEM from *n* mice (4 ND and 8 HFD for control; 14 ND and 15 HFD for FATX-KO). A Student's *t*-test was used for comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ATX, autotaxin; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; FABP, fatty acid binding protein; CD, cluster of differentiation molecule; F4/80, EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1; Glut, glucose transporter; LPL, lipoprotein lipase; FAS, fatty acid synthase; UCP, uncoupling protein; PGC, peroxisome proliferator-activated receptor γ , coactivator.

adipocytes (17), and shows that FATX-KO mice bear an adipocyte-specific disruption of ATX.

Our main finding was that, when fed an HFD, FATX-KO mice exhibited a significantly higher fat mass than control mice. This shows that adipose-specific disruption of ATX increases the sensitivity of adipose tissue to expand when exposed to an HFD, strongly suggesting that adipose tissue-ATX participates in a negative feedback regulation of nutritional obesity. Interestingly, this negative feedback of ATX was not evidenced in mice fed an ND. One can hypothesize that a threshold of ATX ex-

pression needs to be reached to get a negative regulation of fat mass. Thus, ATX expression in control mice is likely too low to exert its inhibitory action so that its disruption in FATX-KO mice has no significant impact on fat mass. In contrast, on an HFD, the expression of ATX is increased above the critical threshold, leading to a significant inhibitory effect on fat mass which, when suppressed in FATX-KO mice, leads to a higher fat mass than in control mice.

The expansion of fat mass in response to HFD is known to result from an increased storage capacity of adipocytes

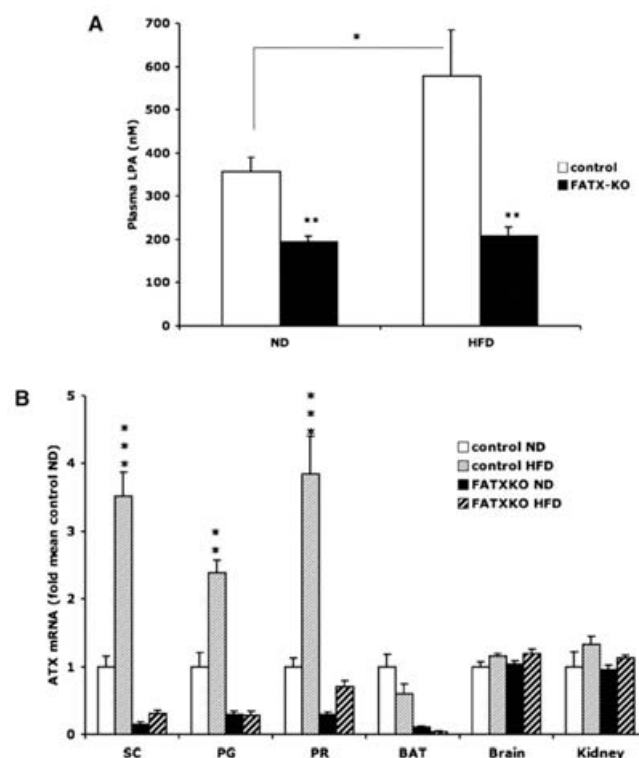


Fig. 6. Adipose-ATX contributes to plasma LPA. Plasma LPA concentration (A) and the expression of ATX gene in perigonadal (PG), subcutaneous (SC), perirenal (PR), brown adipose tissue (BAT), brain, and kidney (B) were quantified in control and FATX-KO male mice fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD). Values are means \pm SEM from 4 control ND, 6 control HFD, 14 FATX-KO ND, and 15 FATX-KO HFD mice. A Student's *t* test was used for comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

combined with the recruitment of new adipocytes by differentiation of dormant preadipocytes, a process termed adipogenesis. We previously demonstrated that LPA, the product of ATX activity, has an anti-adipogenic activity that was associated with downregulation of PPAR γ 2, a master transcription factor involved in adipocyte differentiation (18). We propose that the hypersensitivity of FATX-KO mice to expand fat mass in response to an HFD might result, at least in part, from the alleviation of the anti-adipogenic effect of LPA produced by adipose tissue. This hypothesis is supported by our findings that subcutaneous adipose tissue from FATX-KO mice exhibits an increased expression of PPAR γ 2 and several PPAR γ 2-regulated genes such as aP2, adiponectin, leptin, glut-1, and glut-4 (19, 20). It is unclear why this increase was observed in subcutaneous adipose tissue but not in other fat depots. One possible explanation is that in control mice, the induction by an HFD of ATX expression and LPA production are more pronounced in subcutaneous than in perigonadal. Therefore, the inhibitory action of ATX on

gene expression is expected to be more pronounced in subcutaneous than in perigonadal fat. Consequently, gene upregulation associated with ATX disruption is expected to be more pronounced in subcutaneous than in perigonadal fat. Another possibility is that, in other depots, ATX acts via a different mechanism. Indeed, it was shown that in contrast to subcutaneous fat, visceral fat expansion in response to an HFD does not involve adipogenesis but rather involves an increased storage capacity of existing adipocytes (21). Besides its involvement in adipogenesis, PPAR γ 2 is also known to increase the storage capacity of adipocytes by improving glucose uptake (22). Consequently, in parallel with its anti-adipogenic impact, ATX could also negatively regulate the storage capacity of adipocytes, for example, by inhibiting glucose homeostasis. This hypothesis is supported by our data showing that FATX-KO mice have larger adipocytes and a better glucose tolerance than control mice.

Finally, the present study also provides insight into the contribution of adipose-ATX to plasma LPA levels. ATX is

the main source of plasma LPA (4). Various organs express ATX, including adipose tissue, but their respective contribution to plasma LPA has been elusive. We observed that plasma LPA is significantly reduced in FATX-KO mice when compared with control mice. Conversely, plasma LPA increases when control mice are fed an HFD and this is accompanied by an upregulation of ATX, specifically in white adipose tissue. These observations clearly indicate that up- or down-regulating ATX in white adipose tissue correlates with plasma LPA concentration. Therefore, we conclude that adipose tissue significantly contributes to plasma LPA. In addition, these results show that the mechanisms by which adipose-ATX regulate fat expansion in response to an HFD could result from a combination of a local and endocrine production of LPA by the adipose tissue.

In conclusion, the present study demonstrates that adipose-ATX negatively regulates fat mass expansion in response to an HFD and contributes to plasma LPA levels. Although the mechanism by which it affects the physiology of adipose tissue in mice remains to be clarified, the present work strongly demonstrates the involvement of adipose-ATX in the development of nutritional obesity.

The authors thank Yara Barreira and Myriam Ben-Neji (IFR150, Animal Facility) and Sophie Legonidec and Aurore Desquesnes (IFR150, Functional Exploration Service) for their technological assistance.

REFERENCES

- van Meeteren, L. A., and W. H. Moolenaar. 2007. Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog. Lipid Res.* 46: 145–160.
- Yuellling, L. M., and B. Fuss. 2008. Autotaxin (ATX): a multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matricellular properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1781: 525–530.
- Boutin, J. A., and G. Ferry. 2009. Autotaxin. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 3009–3021.
- van Meeteren, L. A., P. Ruurs, C. Stortelers, P. Bouwman, M. A. van Rooijen, J. P. Pradere, T. R. Pettit, M. J. Wakelam, J. S. Saulnier-Blache, C. L. Mummery, et al. 2006. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol. Cell. Biol.* 26: 5015–5022.
- Tanaka, M., S. Okudaira, Y. Kishi, R. Ohkawa, S. Iseki, M. Ota, S. Noji, Y. Yatomi, J. Aoki, and H. Arai. 2006. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 281: 25822–25830.
- Fotopoulou, S., N. Oikonomou, E. Grigorieva, I. Nikitopoulou, T. Paparountas, A. Thanassopoulou, Z. Zhao, Y. Xu, D. L. Kontoyiannis, E. Remboutsika, et al. 2010. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev. Biol.* 339: 451–464.
- Liu, S., M. Murph, N. Panupinthu, and G. B. Mills. 2009. ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer. *Cell Cycle* 8: 3695–3701.
- Gesta, S., M. F. Simon, A. Rey, D. Sibrac, A. Girard, M. Lafontan, P. Valet, and J. S. Saulnier-Blache. 2002. Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *J. Lipid Res.* 43: 904–910.
- Ferry, G., E. Tellier, A. Try, S. Gres, I. Naime, M. F. Simon, M. Rodriguez, J. Boucher, I. Tack, S. Gesta, et al. 2003. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J. Biol. Chem.* 278: 18162–18169.
- Pradere, J. P., E. Tarnus, S. Gres, P. Valet, and J. S. Saulnier-Blache. 2007. Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771: 93–102.
- Ferry, G., N. Moulharat, J. P. Pradere, P. Desos, A. Try, A. Genton, A. Giganti, M. Beucher-Gaudin, M. Lonchamps, M. Bertrand, et al. 2008. S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327: 809–819.
- Boucher, J., D. Quilliot, J. P. Pradere, M. F. Simon, S. Gres, C. Guigne, D. Prevot, G. Ferry, J. A. Boutin, C. Carpenne, et al. 2005. Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 48: 569–577.
- He, W., Y. Barak, A. Hevener, P. Olson, D. Liao, J. Le, M. Nelson, E. Ong, J. M. Olefsky, and R. M. Evans. 2003. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 15712–15717.
- Morin, C. L., E. C. Gayles, D. A. Podolin, Y. Wei, M. Xu, and M. J. Pagliassotti. 1998. Adipose tissue-derived tumor necrosis factor activity correlates with fat cell size but not insulin action in aging rats. *Endocrinology* 139: 4998–5005.
- Saulnier-Blache, J. S., A. Girard, M. F. Simon, M. Lafontan, and P. Valet. 2000. A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification. *J. Lipid Res.* 41: 1947–1951.
- Barlow, C., M. Schroeder, J. Lekstrom-Himes, H. Kyleford, C. X. Deng, A. Wynshaw-Boris, B. M. Spiegelman, and K. G. Xanthopoulos. 1997. Targeted expression of Cre recombinase to adipose tissue of transgenic mice directs adipose-specific excision of loxP-flanked gene segments. *Nucleic Acids Res.* 25: 2543–2545.
- Graves, R. A., P. Tontonoz, S. R. Ross, and B. M. Spiegelman. 1991. Identification of a potent adipocyte-specific enhancer: involvement of an NF-1-like factor. *Genes Dev.* 5: 428–437.
- Simon, M. F., D. Daviaud, J. P. Pradere, S. Gres, C. Guigne, M. Wabitsch, J. Chum, P. Valet, and J. S. Saulnier-Blache. 2005. Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J. Biol. Chem.* 280: 14656–14662.
- Iwaki, M., M. Matsuda, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Makishima, and I. Shimomura. 2003. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52: 1655–1663.
- Nugent, C., J. B. Prins, J. P. Whitehead, D. Savage, J. M. Wentworth, V. K. Chatterjee, and S. O'Rahilly. 2001. Potentiation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by PPAR gamma agonists is maintained in cells expressing a PPAR gamma dominant-negative mutant: evidence for selectivity in the downstream responses to PPAR gamma activation. *Mol. Endocrinol.* 15: 1729–1738.
- Joe, A. W., L. Yi, Y. Even, A. W. Vogl, and F. M. Rossi. 2009. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells* 27: 2563–2570.
- Takano, H., and I. Komuro. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ. J.* 73: 214–220.

VI. Discussion article 2

Le premier objectif de cette étude était de mettre en évidence le rôle joué par l'ATX dans le tissu adipeux au cours de l'obésité. Pour cela nous avons utilisé le système Cre/lox, sous le contrôle du promoteur aP2, afin d'invalider spécifiquement l'ATX dans les adipocytes. Les souris ainsi obtenues (FATX-KO) ont été soumises à un régime riche en lipides, obésogène. Contrairement aux souris invalidées pour le récepteur LPA1 les souris FATX-KO sont sensibles au régime gras et développent une obésité.

Le principal résultat de ce travail concerne l'expansion de la masse grasse qui est supérieure chez les souris FATX-KO comparativement aux souris sauvages, ce qui fait apparaître l'ATX comme un frein au développement du tissu adipeux. Malgré cette augmentation de la masse de tissu adipeux, le poids des animaux n'augmente pas de manière significative. De plus la prise alimentaire des souris FATX-KO est identique à celle des souris contrôles. Il semblerait que le développement de la masse grasse de ces souris ne soit pas dû à une modification de la balance énergétique, mais à une redistribution des substrats en faveur d'un stockage dans le tissu adipeux. Les mécanismes impliqués dans l'expansion de la masse grasse des souris FATX-KO sont encore mal compris. L'étude de la cellularité de différents dépôts adipeux montre que l'invalidation de l'ATX entraîne une hypertrophie adipocytaire sans mettre en évidence d'hyperplasie. L'hypertrophie est un mécanisme qui touche les adipocytes différenciés. Or, nous avons vu que la cible cellulaire du LPA dans le tissu adipeux est le préadipocyte [47, 161]. Comment l'invalidation de l'ATX dans le tissu adipeux peut elle influencer un mécanisme adipocytaire alors que sa cible principale semble, *a priori*, être le préadipocyte ? Plusieurs hypothèses peuvent être émises à ce sujet. Nous ne pouvons exclure que le peu de récepteurs au LPA exprimés par les adipocytes soit suffisant pour contrôler leur métabolisme en diminuant leur sensibilité à l'insuline ou l'adipogénèse. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse selon laquelle il s'agit d'un mécanisme non catalytique de l'ATX, et donc indépendant des récepteurs au LPA, comme cela a été observé dans les oligodendrocytes [86]. Cette piste ne devrait pas être négligée à l'avenir. En effet, les études récentes sur la structure de l'ATX montrent qu'elle dispose de domaines lui permettant d'interagir avec d'autres partenaires et suggèrent que les effets non catalytiques de l'ATX pourraient passer notamment par sa liaison à des intégrines [67]. Or certaines données montrent que la signalisation associée aux intégrines est capable d'interagir avec les mécanismes d'adipogénèse et la sensibilité à l'insuline [167, 168]. Enfin, il est possible que l'hypertrophie des adipocytes chez les souris FATX-KO résulte d'une programmation précoce

de leur capacité à stocker des triglycérides. Les préadipocytes, cibles du LPA, pourraient subir des modifications épigénétiques affectant ensuite l'expression de gènes des adipocytes différenciés. Ce type de phénomène épigénétique, résultant de méthylations de l'ADN ou de modifications des histones semble de plus en plus incriminé dans le développement de l'obésité [169]. Parmi les gènes adipocytaires, il est suggéré que des régulations spécifiques de certains allèles de PPAR γ puissent jouer un rôle régulateur des capacités de stockage terminales de l'adipocyte [170]. L'augmentation de l'expression du gène de PPAR γ , ainsi que de certains de ses gènes cibles, observée dans le tissu adipeux sous-cutané des souris FATX-KO semble cohérente avec cette dernière hypothèse. De plus, bien qu'à ce jour peu d'études aient mis en évidence des contrôles de modifications épigénétiques par des récepteurs à sept domaines transmembranaires, l'exemple du récepteur de type I à l'angiotensine II contrôlant la méthylation de l'histone H2A démontre que de tels mécanismes peuvent avoir lieu [171].

Chez les souris FATX-KO les modifications d'expressions géniques du tissu adipeux semblent concerner spécifiquement les dépôts sous-cutanés et non périgonadiques alors que l'ATX est invalidée dans ces deux tissus. Les données obtenues récemment grâce à la cristallisation de l'ATX montrent, comme nous l'avons vu précédemment, que l'ATX est capable d'interagir avec d'autres protéines, notamment les intégrines [67]. L'étude de ces interactions avec des protéines membranaires au sein des dépôts adipeux serait intéressante, et pourrait expliquer l'impact différentiel de l'invalidation de l'ATX dans le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux profond. En effet, bien que ces deux dépôts expriment l'ATX, il est possible qu'elle soit retenue de façon plus intense, et donc que son impact fonctionnel soit plus prononcé, dans le tissu sous-cutané, que dans le tissu périgonadique. De plus, un tel mécanisme pourrait être régulé selon les conditions physiopathologiques. En effet, des régulations de certaines intégrines comme l'intégrine- α D, dont l'expression augmente au cours de l'obésité spécifiquement dans le tissu adipeux sous-cutané chez la femme [172], pourraient entraîner une redistribution de l'ATX en faveur de ce tissu lors de la prise de poids.

L'invalidation de l'ATX dans le tissu adipeux améliore la tolérance au glucose des souris soumises au régime gras. Ce résultat traduit une meilleure capacité des organes insulinosensibles (foie, muscles, tissu adipeux) à assimiler le glucose après son administration orale. Ceci semble en contradiction avec les résultats de Yea et al. selon lesquels le LPA augmente l'incorporation de glucose dans des adipocytes et des cellules musculaires [165]. Cependant dans l'étude de Yea et al., il s'agit d'effets aigus du LPA alors que l'utilisation d'animaux transgéniques dans notre étude modifie de façon chronique la production de LPA par l'ATX. L'hyperglycémie provoquée lors du test de tolérance au glucose entraîne une

libération d'insuline permettant aux organes d'incorporer le glucose circulant. L'amélioration de la tolérance au glucose peut résulter de deux mécanismes : une augmentation de la libération d'insuline, ou une plus grande sensibilité à l'insuline des organes périphériques. Des résultats complémentaires (Figure 6) montrent que l'insulinémie n'est pas supérieure, et aurait tendance à être plus faible chez les souris FATX-KO que chez les souris contrôles. Il semblerait donc que la sensibilité à l'insuline soit améliorée chez les souris FATX-KO. Aucun résultat dans notre étude n'indique quels sont les organes concernés par cette augmentation de la sensibilité à l'insuline. Elle pourrait correspondre à un effet local sur le tissu adipeux lui-même, mais pourrait aussi résulter de la levée d'une action systémique négative de l'ATX adipocytaire (via le LPA) sur le métabolisme d'autres organes, notamment le foie et les muscles qui captent la plus grande partie du glucose en réponse à l'insuline. Enfin, l'amélioration de la tolérance au glucose pourrait résulter de l'augmentation des capacités de stockage des acides gras dans le tissu adipeux qui permettrait de limiter les dépôts lipidiques dans les organes périphériques, facteurs importants d'insulinorésistance. Cette dernière hypothèse pourrait être aisément vérifiée en mesurant la quantité de triglycérides présents dans le foie et les muscles des souris.

L'utilisation du régime gras dans cette étude a permis de générer une obésité associée à une intolérance au glucose chez les souris. Nous observons chez les souris contrôles dans cette situation une augmentation de l'expression de l'ATX dans les dépôts adipeux et des taux circulants de LPA. Les études précédentes de l'équipe sur la régulation de l'expression de l'ATX dans le tissu adipeux montraient une augmentation lorsque l'obésité est associée à l'insulinorésistance [162, 164]. Dans ces études l'expression de l'ATX n'était pas augmentée chez des souris soumises à un régime gras. Or dans l'étude présente, l'obésité induite par le régime gras entraîne une surexpression de l'ATX. Cette différence avec les études précédentes peut être due à la durée du régime. Ici les souris ont été soumises au régime gras durant 13 semaines ce qui a engendré une obésité associée à une intolérance au glucose, alors que cette durée n'était que de 8 semaines dans les études précédentes de l'équipe. Les mécanismes régulant l'expression de l'ATX ne sont toujours pas élucidés. L'association constatée entre l'insulinorésistance et l'augmentation de l'ATX suggère l'hypothèse selon laquelle il y aurait une relation entre ces deux phénomènes. L'insulinorésistance pourrait être un facteur responsable de l'augmentation de l'expression de l'ATX. Mais il est aussi possible que l'ATX surexprimée soit impliquée dans la mise en place de l'insulinorésistance. Dans notre étude, l'inactivation de l'ATX améliore la tolérance au glucose des souris. Ceci suggère

que la surexpression de l'ATX dans le tissu adipeux précède et participe à l'établissement de l'insulinorésistance.

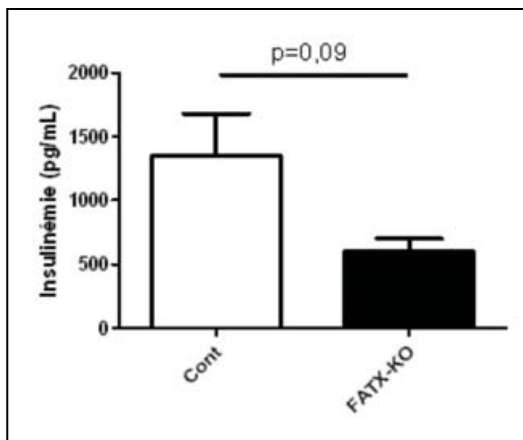


Figure 6 : l'insulinémie n'est pas augmentée chez les souris invalidées pour le gène de l'ATX dans le tissu adipeux.

Des souris contrôles (n=4) ou FATX-KO (n=4) ont été nourries durant 13 semaines par un régime gras. L'insulinémie a été mesurée après une période de jeûne de 6h.

VII. Perspectives de la première partie

Les deux études présentées ici reposent sur l'utilisation de modèles transgéniques d'inactivation soit d'un récepteur au LPA soit de l'ATX. Les rôles de l'ATX et du LPA mis en évidence représentent potentiellement des pistes de développement thérapeutique dans le domaine de l'obésité et des désordres du métabolisme glucidique associés. Dans cette optique, il sera nécessaire de mettre en place des approches pharmacologiques ciblant le couple ATX/LPA. Des outils pharmacologiques sont disponibles pour cibler les récepteurs au LPA. Certains de ces antagonistes ont déjà été utilisés *in vivo* où leur efficacité est donc démontrée. Cependant cibler le tissu adipeux, nécessitera l'utilisation d'agents dirigés contre le récepteur LPA1 qui est un récepteur largement exprimé dans de nombreux tissus. Cette approche serait donc très peu spécifique du tissu adipeux. Par ailleurs, de nombreux inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'ATX sont développés actuellement. Ces derniers pourraient être intéressants puisque l'ATX est surexprimée dans le tissu adipeux uniquement lorsque l'obésité est associée à l'altération du métabolisme glucidique. Ils permettraient alors de cibler son activité enzymatique potentiellement impliquée dans la physiopathologie de l'insulinorésistance. Cependant les résultats attendus lors d'études utilisant des approches pharmacologiques ne seront pas nécessairement identiques à ceux obtenus par des approches transgéniques. L'approche transgénique agit dès le développement embryonnaire et de façon permanente alors que l'approche pharmacologique est réduite au temps de traitement.

Les résultats acquis ici ouvrent aussi des perspectives d'approches pharmacologiques ciblant le couple ATX/LPA en association avec les thiazolidinediones. En effet l'inactivation de l'ATX entraîne une augmentation de l'expression du récepteur nucléaire PPAR γ qui est la

cible des thiazolidinediones, de puissants antidiabétiques. Des études ont récemment mis en évidence des effets secondaires graves de certaines thiazolidinediones ayant entraîné leur retrait du marché [173]. Il serait intéressant d'étudier l'impact d'une inhibition du couple ATX/LPA sur la sensibilité du tissu adipeux aux thiazolidinediones. Une augmentation de cette sensibilité spécifiquement dans le tissu adipeux permettrait d'utiliser les thiazolidinediones à des doses plus faibles afin de diminuer leurs effets secondaires.

Partie 2 : recherche de nouvelles adipokines

I. Introduction

Plusieurs types d'approches ont permis la découverte de nombreuses adipokines : les premières reposent sur l'étude de gènes candidats, l'expression de certains gènes est mesurée dans le tissu adipeux, puis la sécrétion de la protéine correspondante est étudiée ; les secondes sont des études systématiques du transcriptome par l'utilisation de banques d'ADNc puis de puces à ADN permettant d'identifier de possibles adipokines dont la sécrétion par le tissu adipeux est ensuite recherchée ; depuis les années 2000 des études de protéomique sur le sécrétome du tissu adipeux, permettant d'identifier directement des facteurs sécrétés. Par ailleurs quelques travaux étudient les effets du sécrétome du tissu adipeux dans son ensemble, l'identification des facteurs n'étant alors qu'un objectif secondaire.

A. Les études ciblées

Les travaux ayant permis de découvrir des adipokines en ciblant un gène ou une protéine déterminés sont rares. Cependant les facteurs mis en évidence de cette manière font aujourd'hui partie des adipokines les plus étudiées et dont les fonctions sont parmi les plus importantes. De plus c'est grâce à cette approche qu'a été mise en évidence pour la première fois la fonction sécrétoire de l'adipocyte. Ainsi en 1994, l'équipe de Friedman effectue un clonage positionnel dans le but d'isoler des gènes de l'obésité chez la souris. Cinq mutations monogéniques responsables d'obésités étaient déjà identifiées. La mutation *ob* était identifiée en 1950 et son locus localisé grâce à des expériences étudiant la ségrégation du gène lors de méioses. Friedman et ses collaborateurs ont donc cloné cette région. Le gène *ob* ainsi cloné a été séquencé. Il code pour un ARNm de 4,5 kb, dont le codon 105 est muté chez les souris *ob/ob*. La séquence prédictive de la protéine codée indique que cette protéine doit être sécrétée, il s'agit de la leptine [2].

En 2000, c'est l'expression spécifique dans le tissu adipeux du gène de la résistine qui a été pour la première fois mise en évidence par recherche de gènes homologues au gène « *Found in Inflammatory Zone-1* » (*FIZZ1*), une protéine proinflammatoire exprimée au niveau pulmonaire [174].

C'est en raison d'effets de l'apeline sur la prise alimentaire proches de ceux de la leptine qu'a été émise, au sein de notre équipe, l'hypothèse selon laquelle il pourrait s'agir d'une adipokine. Son expression dans le tissu adipeux et ses régulations par la prise de poids et

l'insuline ont ainsi été mises en évidence [13]. Les études menées par l'équipe ont ensuite démontré le rôle majeur de ce peptide dans le métabolisme énergétique [175, 176]. Ce sont aussi des effets sur la prise alimentaire qui ont permis de décrire la nesfatine-1, issue du précurseur *NUCB2* (nonesterified fatty acid/nucleobindin 2), comme une nouvelle adipokine. Ramanjaneya et ses collaborateurs ont étudié l'expression génique de *NUCB2* dans le tissu adipeux humain et murin, ainsi que sa régulation. Les résultats montrent que la nesfatine-1 est une adipokine spécifique du tissu adipeux sous cutané dont l'expression est positivement corrélée au BMI et à la différenciation adipocytaire [177].

Les études ciblées permettent généralement de mettre en évidence des facteurs de fort intérêt, mais, leur nombre reste réduit car leur mise en œuvre nécessite d'avoir un *a priori* sur l'identité du facteur recherché.

B. Les études systématiques

Les études systématiques du transcriptome puis du sécrétome du tissu adipeux ont, elles, permis de découvrir de nombreuses adipokines. En voici quelques exemples.

1. Les recherches sur le transcriptome adipocytaire

Dès 1996, Maeda et ses collaborateurs ont construit une banque d'ADNc à partir de tissu adipeux. Parmi ces transcripts, ils ont identifié un messenger possédant une portion de séquence proche du collagène et un peptide hydrophobe suggérant qu'il s'agissait d'une protéine sécrétée. Cet ADNc étant le gène le plus exprimé dans leur banque, ils l'ont nommé *apM1* (*Adipose Most Abundant Gene Transcript 1*). L'étude de l'expression de ce gène dans de nombreux tissus leur permet de conclure qu'il s'agit d'un gène spécifique du tissu adipeux [178].

Dans une autre étude menée en 1996, Hu et ses collaborateurs, ont identifié le même gène qu'ils ont nommé « *adipoQ* », l'adiponectine. Cette étude est la première faisant intervenir de nouvelles techniques de biologie moléculaire, ici la RT-PCR, qui permettent de détecter de nombreux ARNm. Dès lors, l'enjeu majeur n'est plus d'identifier de nouveaux facteurs, mais de mettre en place des stratégies afin de sélectionner un « sous-transcriptome » représentant le plus grand intérêt scientifique. Les auteurs ont, dans cette étude, comparé l'expression d'ARNm de préadipocytes et d'adipocytes différenciés. Cette technique leur a permis d'isoler des ADNc exprimés préférentiellement dans les adipocytes matures. L'analyse de l'un de ces ADNc a permis de déterminer la séquence de la protéine codée contenant un peptide signal, une répétition de sites G-X-Y de type collagène et une homologie avec la protéine

« complement component 1, q subcomponent » C1q. Les expériences complémentaires ont permis de démontrer que la protéine était effectivement sécrétée, que son expression dépend de la différenciation adipocytaire et qu'elle est spécifique du tissu adipeux [179]. En 2001, Steppan et ses collaborateurs étudient aussi les gènes induits au cours de la différenciation adipocytaire et ciblent parmi eux, ceux qui sont réprimés par un traitement par un antidiabétique, la rosiglitazone. Ils redécouvrent de cette manière la résistine dont l'expression dans le tissu adipeux avait été identifiée en 2000 par Holcomb et ses collaborateurs, et mettent en évidence son implication dans la résistance à l'insuline chez la souris [180].

La masse de tissu adipeux viscéral est plus fortement corrélée aux pathologies associées à l'obésité que le tissu adipeux sous cutané. Cette observation a permis à Yang et ses collaborateurs de découvrir l'omentine, adipokine capable d'augmenter le transport de glucose stimulé par l'insuline. L'analyse différentielle de banques de cDNA obtenues à partir de tissu adipeux omental profond et de tissu adipeux sous cutané a permis d'identifier le gène, spécifique du tissu adipeux viscéral. L'analyse de l'expression de l'omentine par RT-PCR quantitative a démontré que l'expression de l'omentine était due à la fraction stroma vasculaire et non aux adipocytes [181].

L'utilisation des puces à ADN est intéressante afin de comparer l'expression des gènes dans différentes conditions. Yang et ses collaborateurs ont ainsi décrit en 2008 RBP4 (Retinol-Binding Protein 4) comme nouvelle adipokine s'opposant à l'action de l'insuline. Pour cela, a été réalisé un « screening » des gènes différentiellement exprimés dans le tissu adipeux de souris insulino-résistantes et diabétiques invalidées pour le transporteur Glut-4 spécifiquement dans le tissu adipeux. Cette technique a permis aux auteurs d'identifier cinq adipokines dont RBP4 [182].

L'INHBB (Inhibine Beta B) a été mise en évidence comme adipokine en déterminant, grâce à des puces à ADN, les gènes exprimés préférentiellement dans le tissu adipeux sous cutané [183]. L'augmentation de son expression au cours de l'adipogénèse, sa sécrétion par les adipocytes, et ses effets anti-lipolytiques ont ensuite été démontrés [184, 185].

2. Les recherches sur le sécrétome adipocytaire

L'étude des protéines sécrétées par le tissu adipeux, ou les adipocytes a été menée grâce à de multiples outils de protéomique depuis les dernières années. Le sécrétome du tissu adipeux comportant de nombreux facteurs, des techniques de séparations sont souvent utilisées afin de simplifier sa composition. L'électrophorèse en gel mono ou bidimensionnel est une des techniques de séparation les plus répandues. En électrophorèse bidimensionnelle, les protéines

sont dans un premier temps séparées selon leur point isoélectrique puis selon leur poids moléculaire. Cette technique permet d'isoler les différents facteurs au sein d'un gel et d'analyser par spectrométrie de masse ces facteurs. Aujourd'hui la spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide permet d'analyser directement des échantillons contenant de nombreux facteurs isolés par une simple électrophorèse monodimensionnelle. Mais comme nous l'avons déjà vu dans les études du transcriptome, la principale difficulté est de mettre en place des stratégies capables de mettre en évidence les facteurs d'intérêt au sein des nombreux facteurs que ces techniques permettent d'identifier.

En 2002, Kratchmarova et ses collaborateurs publient une des premières études du sécrétome adipocytaire. Suite à une séparation par électrophorèse monodimensionnelle des protéines issues de MC de préadipocytes et d'adipocytes, les auteurs ont sélectionné les facteurs différentiellement exprimés au cours de la différenciation adipocytaire. Ces facteurs ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse. Grâce à cette approche ils mettent notamment en évidence la sécrétion par les préadipocytes du « Pigment Epithelium-Derived Factor » (PEDF) et la sécrétion par les adipocytes de « l'hippocampal cholinergic neurostimulating peptide », de la lipocaline associée à la gélatinase neutrophile, et de l'haptoglobine [186]. Cette stratégie visant les facteurs dont l'expression est modifiée par la différenciation adipocytaire est la plus répandue dans les études de protéomique. Elle est ainsi réutilisée par Zvonic et ses collaborateurs en 2007. Dans cette étude ils analysent les facteurs sécrétés par des préadipocytes et des adipocytes issus de cultures primaires à partir de tissu adipeux mammaire humain. Une approche d'électrophorèse bidimensionnelle couplée à une analyse en spectrométrie de masse leur permet d'identifier 80 protéines dont l'expression est au moins deux fois supérieure dans les adipocytes différenciés par rapport aux préadipocytes. Parmi ces 80 protéines les auteurs identifient, les serpinines, une famille d'inhibiteurs de sérine protéases, potentiellement impliquées dans les pathologies associées à l'obésité [187]. En 2010 Zhong et ses collaborateurs utilisent une approche de protéomique quantitative sur l'ensemble du sécrétome d'adipocytes humains au cours de leur différenciation. Pour cela, ils combinent une analyse des facteurs par spectrométrie de masse et par « antibody array » (dosage immunologique). Cette étude a identifié 420 protéines du sécrétome des adipocytes différenciés. La plupart de ces facteurs sont différentiellement exprimés au cours de la différenciation adipocytaire [188].

En 2004, Wang et ses collaborateurs choisissent d'étudier les facteurs dont la sécrétion est bloquée par une température de 20°C et/ou par un traitement par la bréfeldine A, un agent bloquant la sécrétion des protéines en interagissant avec l'appareil de Golgi, afin de

déterminer les facteurs activement sécrétés. Des expériences de spectrométrie de masse couplées à une électrophorèse en 2 dimensions ont permis d'identifier 41 protéines sécrétées. Ils ont ainsi mis en évidence la sécrétion de certaines protéines pour la première fois (Prohibitine, Protéine de stress-70, and adhesion-regulating molecule 1). Cette étude a aussi permis d'identifier de nouvelles adipokines dont certaines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (procollagen C-proteinase enhancer protein), ou des facteurs de croissance (galectin-1,) [189]. En 2007 Alvarez-Llamas et ses collaborateurs incubent des explants de tissu adipeux en présence de lysine marquée pour caractériser le sécrétome du tissu adipeux viscéral humain. Les protéines du milieu de culture sont ensuite analysées par spectrométrie de masse. Grâce à cette méthode les auteurs ont identifié 259 protéines dans le milieu de culture, parmi ces protéines 70 ont incorporé la lysine marquée et sont donc considérées comme les protéines synthétisées et sécrétées par le tissu adipeux [190].

Lim et ses collaborateurs ont eux, en 2008, focalisé leur recherche sur des facteurs d'intérêt diagnostique. Ils ont identifié 97 adipokines sécrétées par des adipocytes immortalisés de souris et 203 dans des adipocytes de rat en culture primaire. Afin de dégager les facteurs d'intérêt, ils ont induit par deux méthodes différentes une l'insulinorésistance dans les cellules. Cette méthode leur a permis d'identifier de nombreux facteurs régulés positivement ou négativement dans cette situation parmi lesquels la quiescine Q6, l'angiotensine, la lipoprotéine lipase, la « matrix metalloproteinase 2 », et slit homologue 3 [191].

L'avantage évident de ces approches systématiques du transcriptome ou du sécrétome du tissu adipeux est de mettre en évidence des adipokines nouvelles et en grand nombre. Cependant la relevance physiologique de ces sécrétions reste souvent imprécise.

C. Etudes fonctionnelles du sécrétome du tissu adipeux

Certaines études, portant sur les sécrétions du tissu adipeux, ne cherchent pas prioritairement à identifier les facteurs sécrétés mais s'intéressent d'abord aux réponses cellulaires qu'ils génèrent, en particulier celles participant aux désordres métaboliques associés à l'obésité. Ces études portent sur l'ensemble des sécrétions du tissu adipeux présentes dans des MC ou dans des surnageants de cocultures. Cette approche a l'avantage de créer des conditions se rapprochant de la physiologie où les mécanismes cellulaires ne sont pas régulés par des facteurs isolés mais résultent de l'action simultanée de nombreux facteurs agissant de façon synergique, additive, ou antagoniste.

1. Effets des sécrétions du tissu adipeux sur des hépatocytes

Le foie est un des principaux organes impliqués dans la régulation du métabolisme glucidique, il capte le glucose plasmatique, et le stocke sous forme de glycogène. Cet organe est potentiellement une cible des adipokines, notamment celles sécrétées par le tissu adipeux viscéral dans le flux portal. Plusieurs études ont été menées sur des hépatocytes traités par des MC de tissu adipeux. Il a ainsi été démontré que les sécrétions de tissu adipeux sous-cutané humain induisaient une accumulation de triglycérides dans la lignée Huh-7, phénomène qui conduirait *in vivo* à la mise en place d'une stéatose. Cet effet étant réduit en présence d'un anticorps dirigé contre MCP1, les auteurs l'attribuent à cette cytokine. MCP1 activerait la voie de signalisation de ERK et permettrait l'accumulation des triglycérides en augmentant l'expression de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), qui contrôle l'estérification des lipides, et en diminuant la sécrétion d'ApoB [192]. Des expériences menées sur la lignée hépatocytaire humaine HepG2 montrent qu'un MC d'adipocytes mammaires en culture primaire diminue la phosphorylation d'Akt, et de la glycogène synthase kinase (GSK3) en réponse à l'insuline [193]. Enfin, une étude montre que des MC d'adipocytes de la lignée 3T3-L1 traités par du TNF α induisent une réponse à l'insuline dans des hépatocytes de la lignée FAO (phosphorylation du récepteur à l'insuline, d'IRS, d'Akt et de GSK3) inférieure de 45% à la réponse obtenue avec des MC d'adipocytes non traités. L'inhibition de l'action de l'IL1- β permettant de bloquer cet effet, il semble que ce soit le facteur responsable [194].

2. Effets des sécrétions du tissu adipeux sur des cellules musculaires

Les sécrétions du tissu adipeux peuvent agir sur les cellules musculaires par une voie de communication endocrine, mais aussi de façon paracrine, notamment celles provenant du tissu adipeux sous cutané entourant certains muscles, ou d'adipocytes intramusculaires. L'effet des sécrétions du tissu adipeux a été étudié sur les cellules musculaires traitées par des MC ou en coculture avec des adipocytes. La coculture de myocytes avec des adipocytes humains issus de culture primaire réduit la réponse à l'insuline des myocytes. Cela se traduit par une altération de la voie de signalisation de l'insuline (phosphorylation d'Akt, d'IRS-1, de GSK3 en réponse à l'insuline). Le TNF α et la résistine ne semblent pas être responsables de cette insulino-résistance, leurs concentrations sont trop faibles dans les milieux de culture pour engendrer de tels effets [195, 196]. La perturbation de la signalisation de l'insuline dans les cellules musculaires s'accompagne d'une augmentation de leur statut inflammatoire se manifestant notamment par une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IL-6 [197].

Ces résultats, obtenus en cocultivant des myocytes avec des adipocytes, sont confirmés par des traitements de myocytes par des MC d'adipocytes. En effet, dans ces conditions la phosphorylation des protéines de signalisation de l'insuline est réduite, ainsi que la stimulation de la translocation à la membrane du transporteur Glut-4 et du transport de glucose [196]. Ces effets étant partiellement inhibés par les antagonistes du récepteur CB1R (Récepteur aux Cannabinoïdes de type 1), ils pourraient être dus en partie à des endocannabinoïdes qui activent notamment la voie des MAP-Kinases [198]. D'autre part, une étude montre que les sécrétions d'adipocytes issus du tissu adipeux profond induisent, dans les cellules musculaires, une insulino-résistance plus importante que celles des adipocytes du tissu adipeux sous-cutané. De plus cet effet semble corrélé positivement à la taille adipocytaire [199].

II. Objectifs de la seconde partie

Nous avons vu ici les principales approches qui ont conduit à la découverte de la plupart des adipokines. Chacune de ces approches comporte des avantages et des inconvénients. L'étude des effets biologiques engendrés par les MC de tissu adipeux met clairement en évidence l'existence de facteurs sécrétés bioactifs. Les effets les mieux décrits à ce jour portent notamment sur des perturbations du métabolisme glucidique et l'effet proinflammatoire des sécrétions du tissu adipeux. Se pose alors la question de l'identification des facteurs responsables. Si un facteur particulier est suspecté, il est possible de tester son implication à l'aide par exemple d'anticorps bloquants ou d'agents pharmacologiques. C'est ainsi que Clément et ses collaborateurs ont proposé la participation du facteur MCP1 dans les effets des MC sur l'accumulation de lipides dans les hépatocytes [192], ou encore, que des ligands du récepteur CB1R ont été impliqués dans l'induction de l'insulino-résistance dans des cellules musculaires par les sécrétions adipocytaires [198]. Si aucun facteur n'est précisément suspecté il faut développer des procédures particulières de purification et d'identification. C'est ce que nous proposons dans l'étude qui suit, visant à mettre en évidence de nouveaux facteurs actifs sécrétés par le tissu adipeux. Notre approche a tout d'abord consisté à mettre en évidence des effets biologiques, liés au métabolisme glucidique, engendrés par le milieu extracellulaire du tissu adipeux (milieu conditionné). Compte tenu du nombre très important de molécules présentes dans le MC mais qui ne sont pas toutes nécessairement actives, nous avons tenté d'isoler une fraction de ce MC capable de reproduire les effets biologiques engendrés. Cette démarche permet ainsi d'isoler un « sous-sécrétome » contenant un nombre

plus restreint de molécules bioactives, dont l'analyse par spectrométrie de masse devrait par la suite être plus aisée.

III. Matériel et méthode

- **Culture cellulaire**

Les lignées cellulaires sont cultivées à 37°C en atmosphère humide composée de 5% de CO₂. Le milieu de culture de base utilisé est du DMEM contenant des antibiotiques (pénicilline, streptomycine : 1 µg/mL) et supplémenté en sérum et en glucose (4,5 g/L).

La lignée C2C12, myoblastes murins capables de se différencier en myotubes, est maintenue à l'état de myoblastes prolifératifs en les cultivant en DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) en boîtes de 10 cm de diamètre, et en les repiquant à 80% de confluence à raison de 30000 à 70000 cellules par boîte. Pour les mesures d'expression génique, les cellules C2C12 sontensemencées dans des plaques 12 puits à raison de 7500 cellules par puits contenant 1 mL de DMEM supplémenté avec 10% de SVF. Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, elles sont cultivées en DMEM supplémenté avec 2% de sérum de cheval afin d'induire leur différenciation en myotubes. Ce même milieu de culture est ensuite renouvelé tous les 2 jours.

La lignée de préadipocytes 3T3F442A est maintenue à l'état prolifératif en cultivant les cellules en DMEM supplémenté avec 10% de SVF en boîtes de 10 cm de diamètre, en les repiquant à 80% de confluence à raison de 150000 cellules par boîte. Pour les mesures d'expression génique, les cellules 3T3F442A sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 10000 cellules par puits contenant 1 mL de DMEM supplémenté avec 10% de SVF. Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont cultivées en DMEM supplémenté avec 10% de SVF et de l'insuline bovine à 50 nM afin d'induire leur différenciation en adipocytes. Ce même milieu de culture est ensuite renouvelé tous les 2 jours.

Les cellules de la souche préadipocytaire SGBS [200] sont maintenues à l'état prolifératif en les cultivant en DMEM F12 supplémenté avec 10% de SVF en boîtes de 10 cm de diamètre, en les repiquant à 80% de confluence à raison de 100000 cellules par boîte. Pour les mesures d'expression génique et d'incorporation de glucose, les cellules SGBS sontensemencées dans des plaques 12 puits à raison de 15000 cellules par puits contenant 1 mL de DMEM F12 supplémenté avec 10% de SVF. Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont cultivées durant 4 jours en DMEM F12 supplémenté avec de la transférine humaine à 10 µg/mL, de l'insuline à 20 nM, du cortisol à 0,1 µM, de la T3 à 0,2 nM, de la biotine à 0,8 µg/L et du pantothénate à 0,4 µg/L de la dexaméthasone à 25 nM, de l'IBMX à 500 µM, et de

la rosiglitazone à 2 μ M. Puis le milieu est remplacé par du DMEM F12 supplémenté avec de la transférine humaine à 10 μ g/mL, de l'insuline à 20 nM, du cortisol à 0,1 μ M, de la T3 à 0,2 nM, de la biotine à 0,8 μ g/L et du pantothénate à 0,4 μ g/L et renouvelé tous les 2 jours.

Les traitements par les MC de tissu adipeux ont été réalisés durant 48h. Le traitement des myocytes C2C12 est réalisé à partir de la confluence. Le milieu de culture est remplacé par 1 mL de MC dilué au demi dans du DMEM, le tout est supplémenté à 2% en sérum de cheval. Le traitement des adipocytes 3T3F442A est réalisé à partir du 8^{ème} jour après la confluence. Le milieu de culture est remplacé par 1 mL de MC dilué au demi dans du DMEM, le tout est supplémenté à 10% de SVF. Le traitement des adipocytes SGBS est réalisé à partir du 12^{ème} jour après la confluence. Le milieu de culture est remplacé par 1 mL de MC dilué au demi dans du DMEM F12 supplémenté avec de la transférine humaine à 10 μ g/mL, de l'insuline à 20 nM, du cortisol à 0,1 μ M, de la T3 à 0,2 nM, de la biotine à 0,8 μ g/L et du pantothénate à 0,4 μ g/L.

- **Tissu adipeux humain**

L'étude a été menée conformément à la déclaration d'Helsinki et le tissu adipeux humain a été collecté conformément aux directives et à l'approbation du comité d'éthique de l'hôpital de Rangueil à Toulouse. Le tissu adipeux provient de patients sains ayant subi une dermolipectomie abdominale dans le cadre d'une chirurgie réparatrice (IMC compris entre 21,5 kg/m² et 33,6 kg/m²).

- **Animaux**

Les expériences ont été menées sur des souris C57BIKSJ nourries durant 13 semaines avec un régime gras (4730 kcal/kg: protéines 20%, glucides 35%, et lipides 45% (Research Diet, France)) à partir de la 10^{ème} semaine. Ces souris sont élevées au laboratoire à température et humidité ambiantes (20-22°C et 50-60% d'humidité) avec un cycle jour/nuit de 12h/12h (lumière à 7h00). Toutes les souris ont un libre accès à la nourriture et à l'eau. Les souris ont été sacrifiées à l'âge de 23 semaines par dislocation cervicale, et les tissus adipeux périgonadique (PG) et sous-cutané (SC) ont été prélevés. Les expériences ont été réalisées en accord avec les principes et méthodes de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

- **Préparation des milieux conditionnés**

Les MC sont préparés dans du DMEM contenant des antibiotiques (pénicilline, streptomycine : 1 μ g/mL). Ce véhicule est utilisé comme contrôle des MC dans les expériences. Les dépôts de tissu adipeux PG et SC des souris ou le tissu adipeux humain sont prélevés puis découpés en explants de quelques millimètres de côté à l'aide de ciseaux.

Chaque type de tissu adipeux est ensuite rincé dans du PBS puis placé dans du DMEM (1mL DMEM/100mg de tissu adipeux). Le milieu est alors maintenu 4 h à 37°C dans un bain marie sous agitation lente. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 min à 1900 g à 4°C afin de séparer la phase aqueuse, du tissu adipeux et des triglycérides libérés par lyse des adipocytes (haut du tube) ainsi que des débris cellulaires (culot). La phase aqueuse intermédiaire est prélevée à l'aide d'une seringue et d'une aiguille, puis filtrée à travers un filtre de 0,22 µm. Les MC ainsi obtenus sont congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

- **Isoélectrofocalisation**

Dans une première étape, les sels sont éliminés du MC par dialyse. Un volume de MC est dialysé à travers une membrane d'ester de cellulose, dont les pores permettent d'éliminer les molécules de poids moléculaire inférieur 0,5-1 kD (Spectrum Laboratories), contre 100 volumes d'eau milliQ durant 12 heures. Des ampholytes (Bio-Lyte 3/10 Ampholyte, Bio-Rad) sont ajoutés au MC à la concentration de 1%. L'isoélectrofocalisation est réalisée grâce au Rotofor (Bio-Rad). Le milieu contenant les ampholytes est placé dans une chambre de focalisation divisée en 20 espaces par des membranes perméables. Un courant électrique de puissance constante égale à 15 W est appliqué dans la chambre de focalisation par deux électrodes reliées à un générateur. La cathode est constituée d'une membrane échangeuse d'anions et d'une solution de NaOH à 0,1 M. L'anode est constituée d'une membrane échangeuse de cations et d'une solution de H₃PO₄ à 0,1 M. L'application du champ électrique permet la constitution d'un gradient de pH par les ampholytes et la répartition des protéines dans les différents espaces de la chambre de focalisation selon leur point isoélectrique. La température de la chambre de focalisation est maintenue constante grâce à une circulation d'eau à 2°C. Durant la durée de la focalisation, la tension électrique entre les électrodes est régulièrement mesurée. La focalisation est stoppée 30 min après stabilisation de cette tension. Toutes les fractions contenues dans chaque espace de la chambre de focalisation sont récupérées par une aspiration simultanée. Le pH de chaque fraction est mesuré afin de valider le gradient de pH constitué lors de la focalisation. Les fractions sont stockées à -80°C.

- **Incorporation de glucose dans les adipocytes SGBS**

Les cellules sont rincées avec du DMEM contenant seulement 2,78 mM de glucose puis incubées 3 heures dans 1 mL de ce milieu. De l'insuline bovine est ensuite ajoutée au milieu à 50 nM ainsi que 10 µL d'une dilution isotopique de glucose tritié (concentration finale : 2,78 mM de glucose ; 0,7 mCi/L) durant 90 min. Les cellules sont ensuite rincées avec 1 mL de PBS, et lysées dans 400 µL de NaOH à 0,05 N. La radioactivité est mesurée sur 300 µL de lysat placés dans du liquide scintillant (EmulsifierSafe).

• Expression génique

L'extraction des ARN est réalisée grâce au kit RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Une transcription inverse est effectuée sur 500 ng d'ARN totaux pendant 60 min à 37°C par la Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) en présence d'hexamères aléatoires. Afin d'assurer l'absence de contamination par l'ADN génomique la même réaction est réalisée sans transcriptase inverse. La PCR en temps réel est réalisée à partir de 12,5ng d'ADNc et de 100 à 900 nM d'amorces oligonucléotidiques spécifiques des gènes mesurés dans un volume final de 20 µL grâce au Mesa blue QPCR Master Mix for Sybr (Eurogentec). La fluorescence est mesurée et analysée par un système de PCR en temps réel StepOnePlus (Applied Biosystems). L'analyse de l'ARN ribosomique 18S est réalisée en parallèle en utilisant le kit de contrôle des ARN ribosomique Taqman (Applied Biosystem) afin de normaliser le niveau d'expression génique. Les résultats sont exprimés de la manière suivante : $2^{(Ct_{18S} - Ct_{RT+})} \times (1 - 1/2^{(RT- - RT+)})$ où Ct correspond au nombre de cycle requis pour générer un signal fluorescent supérieur à un seuil prédéfini. Les amorces oligonucléotidiques spécifiques des gènes ciblés sont conçues grâce au logiciel Primer Express (Applied Biosystems). Les séquences des amorces oligonucléotidiques sont listées dans le Tableau 3.

Gène cible	Espèce	Séquence des amorce oligonucléotidiques	
		Sens	Antisens
MCP1	Humain	CAAGCAGAAGTGGGTCAGGAT	TCTTCGGAGTTTGGGTTTGC
MCP1	Souris	GCAGTTAACGCCCCACTCA	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
IL-6	Souris	GCCACCAAGAACGATAGTCA	CAAGAAGGCAACTGGATGGAA

Tableau 3 : séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour les mesures d'expression génique par RT-qPCR

MCP1 : Monocyte Chemotactic Protein 1 ; IL-6 : Interleukine 6

IV. Résultats préliminaires

• Les sécrétions du tissu adipeux perturbent le métabolisme glucidique

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les sécrétions du tissu adipeux contiennent des facteurs capables de perturber le métabolisme glucidique, des adipocytes SGBS ont été traités par des MC de tissu adipeux humain durant 48h. L'incorporation de glucose radiomarké a ensuite été mesurée dans ces adipocytes en conditions basales ou en présence d'insuline (50 nM). Le traitement par les MC diminue de 32% la quantité de glucose incorporé dans les adipocytes en présence d'insuline sans modifier l'incorporation basale (Figure 7). Ce résultat

montre qu'il y a, parmi les sécrétions du tissu adipeux, dans les MC un ou des facteurs capables d'inhiber partiellement l'action de l'insuline sur des adipocytes.

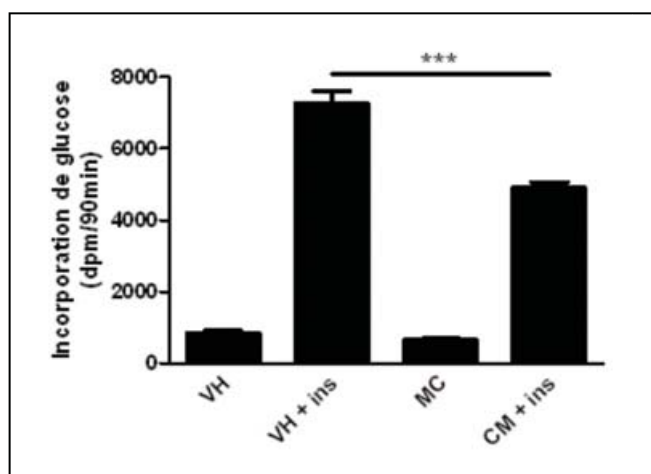


Figure 7 : incorporation de glucose par des adipocytes traités par le véhicule ou par des milieux conditionnés de tissu adipeux humain
Des adipocytes SGBS différenciés 14 jours ont été traités 48h par des MC de tissu adipeux humain. L'incorporation de glucose radiomarqué a été mesurée en conditions basales ou après stimulation par l'insuline à 50 nM durant 45 min. *** $p < 0.001$

- **Les sécrétions du tissu adipeux exercent un effet proinflammatoire sur les adipocytes et les myocytes**

Les perturbations du métabolisme glucidique étant généralement associées à la mise en place d'un état inflammatoire dans les tissus, l'expression génique de cytokines inflammatoires a été mesurée dans des adipocytes traités durant 48h par des MC de tissu adipeux. Les adipocytes humains (souche SGBS) et murins (lignée 3T3F442A) ont été traités par des MC, de tissu adipeux humains et de souris obèses respectivement. Ce traitement entraîne une augmentation de 1,9 fois de l'expression de la cytokine MCP1 (Monocytes Chemotactic Protein 1) dans les adipocytes SGBS (Figure 8A) et d'environ 1,9 fois de l'expression de la cytokine IL-6 (interleukine 6) dans les adipocytes 3T3F442A (Figure 8B).

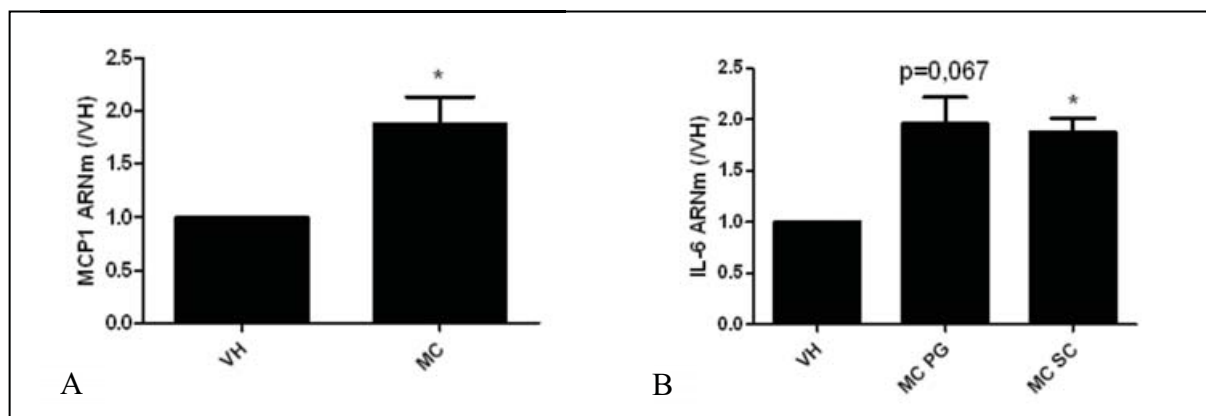


Figure 8 : expression génique de cytokines inflammatoires par des adipocytes traités par des milieux conditionnés de tissu adipeux

A : des adipocytes SGBS ont été traités durant 48h par MC de tissu adipeux humain ; ou B : des adipocytes 3T3F442A ont été traités durant 48h par MC de tissu adipeux SC et PG de souris HFD ; puis l'expression génique de MCP1 et IL-6 a été mesurée par RT-qPCR.

* $p < 0.05$

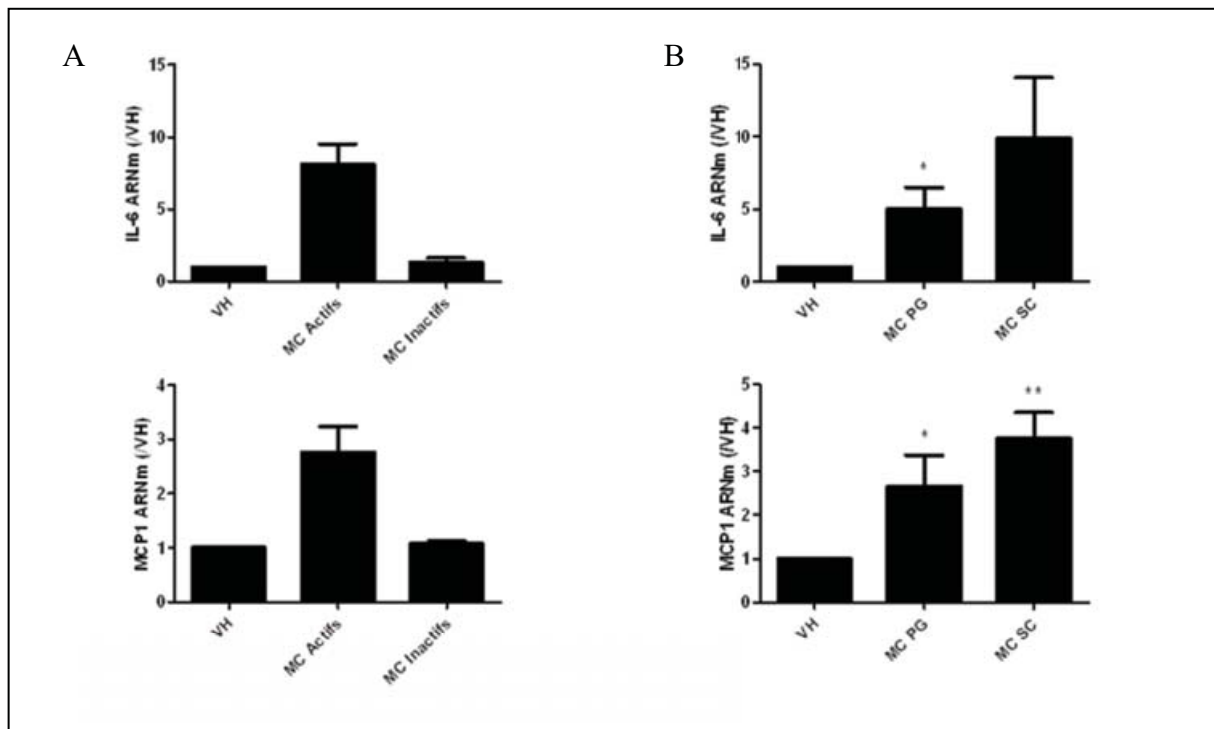


Figure 9 : expression génique de cytokines inflammatoires par des myocytes traités par le véhicule ou par des milieux conditionnés de tissu adipeux

Des myocytes de la lignée C2C12 ont été traités durant 48h par des MC A : de tissu adipeux humain ; B : de tissu adipeux PG et SC de souris HFD ; puis l'expression d'IL-6 et MCP1 a été mesurée par RT-qPCR.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Afin de vérifier si les effets, constatés sur les adipocytes, des sécrétions adipocytaires présentes dans les MC sont généralisables à d'autres types cellulaires nous les avons étudiés sur les myocytes. Des myocytes murins (lignée C2C12) ont ainsi été traités durant 48h par les MC de tissu adipeux humain. La puissance des effets observés varie fortement selon le patient à partir duquel le MC a été préparé. Certains MC préparés avec le tissu adipeux de certains patients entraînent une forte augmentation d'environ 8 et 2,8 fois de l'expression d'IL-6 et MCP1, d'autres MC n'ont pas d'effet sur cette expression (Figure 9A). Ceci suggère la présence dans les milieux actifs de facteurs bioactifs qui seraient absents des milieux inactifs. Le traitement des myocytes (lignée murine C2C12) par des MC de tissu adipeux de souris obèses entraîne une augmentation de plus de 5 et 2,5 fois de l'expression génique des cytokines inflammatoires IL-6 et MCP1 (Figure 9B).

• Fractionnement des milieux conditionnés par isoélectrofocalisation

Comme nous l'avons vu en introduction, notre démarche dans cette étude consiste à isoler un « sous-sécrétome » contenant un nombre plus restreint de molécules bioactives, dont l'analyse par spectrométrie de masse devrait par la suite être plus aisée. Nous avons donc fractionné les MC de tissu adipeux humain issus de 3 patientes (P1 : femme, 39 ans, BMI

33,6 ; P2 : femme, 289 ans, BMI 30,1 ; P3 : femme, 51 ans, BMI 27,4). Les MC ont été fractionnés par isoélectrofocalisation c'est-à-dire selon le point isoélectrique des protéines (Figure 10). Afin de comparer les différentes fractions de MC à un contrôle approprié, et de s'affranchir des effets dus aux ampholytes utilisés pour le fractionnement, nous avons aussi fractionné par isoélectrofocalisation du DMEM (VH) utilisé pour la préparation des MC. Des myocytes de la lignée C2C12 ont ensuite été traités durant 48 heures par ces fractions, de MC ou de VH, contenant des protéines différentes de points isoélectriques définis. L'activité biologique des fractions issues des MC de chaque patiente ou du VH a été mesurée dans quatre expériences indépendantes (P1, P2, P3 et VH).

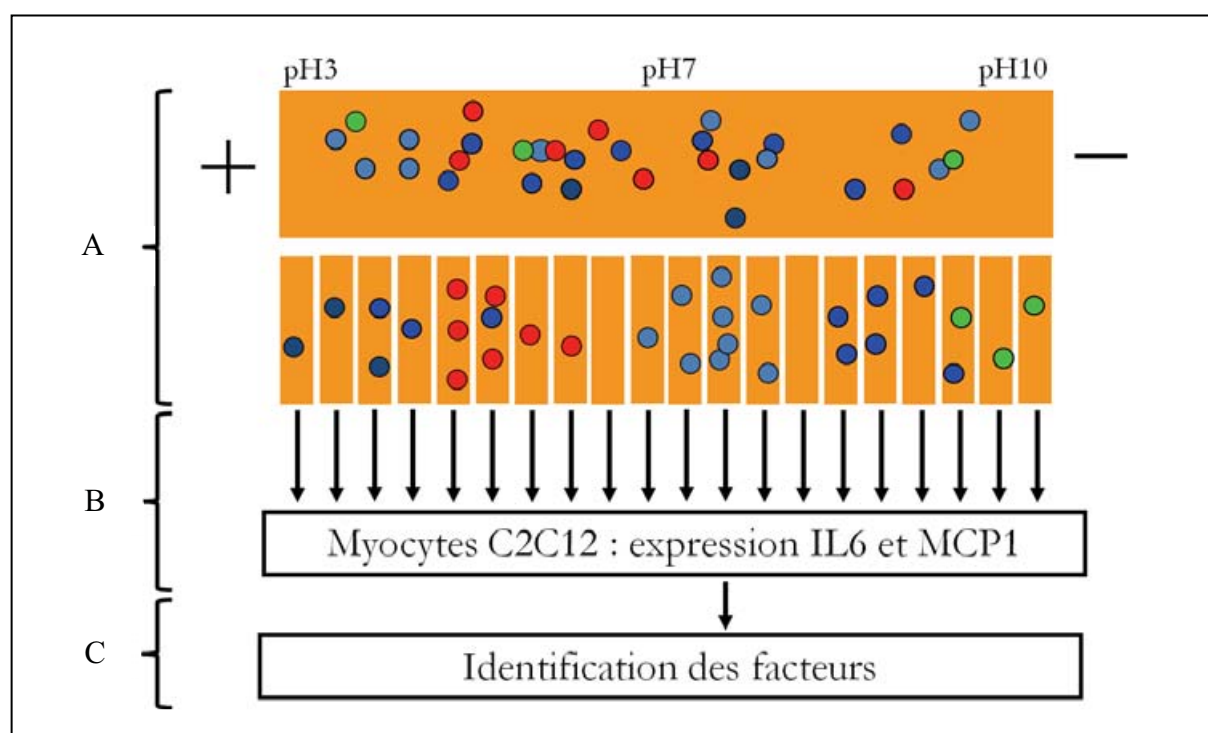


Figure 10 : stratégie d'isolement et d'identification de facteurs actifs

A : Fractionnement des MC en 20 fractions par isoélectrofocalisation.

B : Sélection des fractions d'intérêt.

C : Identification des facteurs présents dans les fractions sélectionnées.

L'induction de l'expression des cytokines inflammatoires est mesurée par rapport à l'expression basale dans des myocytes C2C12 non traitées au cours de la même expérience. Dans ces premières expériences, le profil d'expression des cytokines inflammatoires IL-6 et MCP1 selon le pH des fractions montre des pics dans les cellules traitées par les fractions ayant un pH d'environ 9 et dans une moindre mesure dans celles traitées par les fractions de pH proche de 6 (Figure 11). Ces fractions, qui reproduisent un effet biologique des MC ont été sélectionnées pour les expériences suivantes, elles sont notées a, b, c, d, e, f, g et h (Tableau 4). Les profils d'expression sont semblables pour les fractions des MC issus des

patientes P1 et P2, alors que les pics apparaissent moins distinctement pour les fractions du MC issu de la patiente P3 et du VH (Figure 11).

Une nouvelle expérience a été réalisée afin de comparer l'intensité de l'activité biologique des fractions sélectionnées pour leur activité biologique, et provenant de patientes différentes, en s'affranchissant de la variabilité « inter-expérience ». Dans une même expérience, nous avons mesuré l'induction de l'expression des cytokines inflammatoires IL-6 et MCP1 dans des myocytes C2C12 traités par les fractions a, b, c, d, e, f, g et h. Les fractions sélectionnées ayant un pH d'environ 6 (notées a, c, e et g) induisent très faiblement l'expression des cytokines inflammatoires IL-6 et MCP1 quelque soit la patiente dont elles sont issues (Figure 12). Les fractions sélectionnées, issues des patientes P1 et P2, dont le pH est proche de 9 (notées b et d) induisent fortement l'expression d'IL-6 (environ 9 fois) et de MCP1 (environ 6 fois) (Figure 12). Les fractions sélectionnées de pH proche de 9 issues de la patiente P3, ou du VH, (notées f et h) induisent faiblement l'expression d'IL-6 et de MCP1 (Figure 12). Ces résultats indiquent que les fractions b et d issues des patients P1 et P2 contiennent un/des facteurs d'intérêt qui ne sont pas ou peu présents dans les fractions f issues du patient P3 qui ont une activité biologique équivalente à celle des fractions h issues du VH.

Les futures étapes d'identification des facteurs d'intérêt sécrétés par le tissu adipeux devront donc se concentrer sur les facteurs présents dans les fractions b et d, et absents des fractions f.

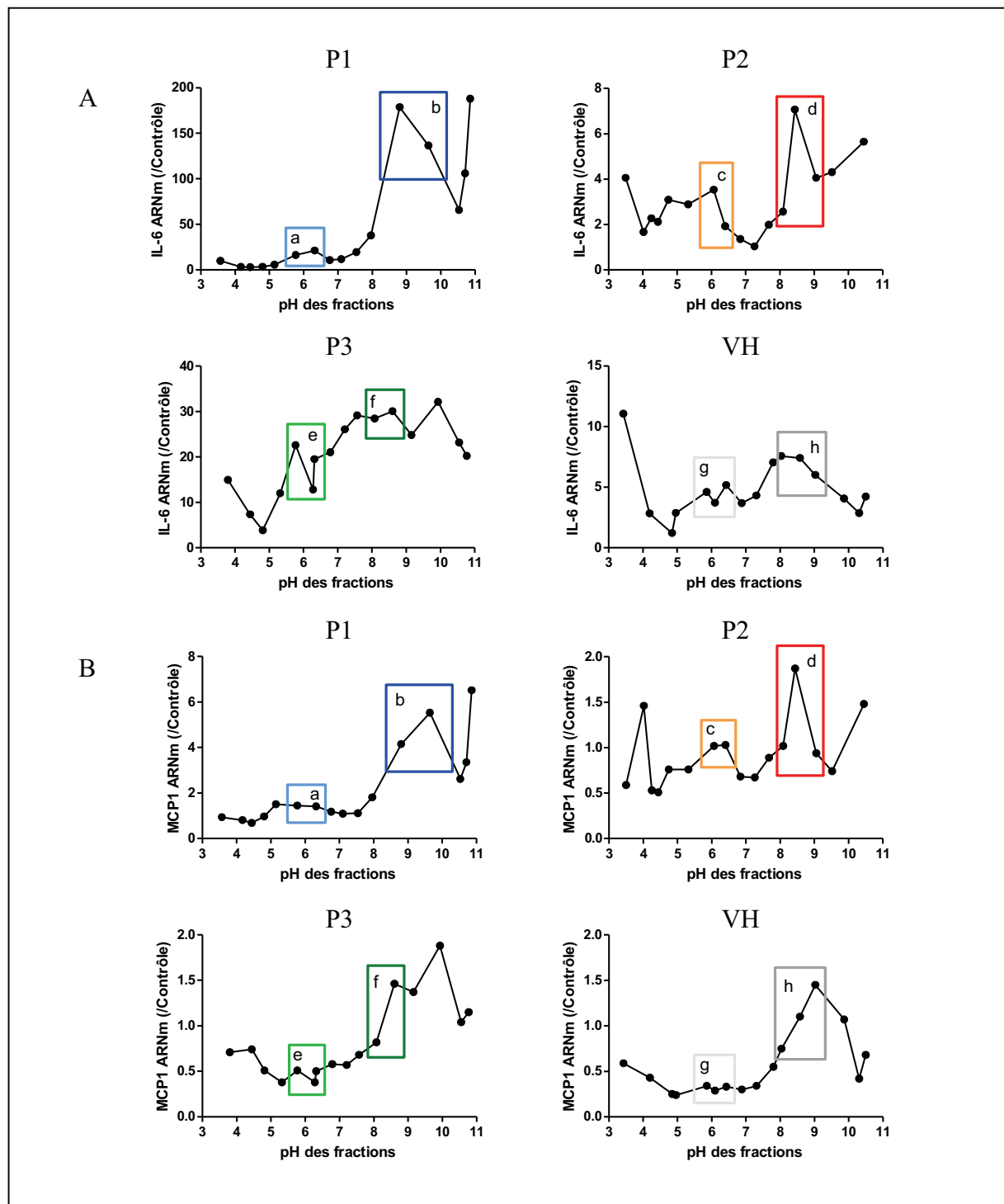


Figure 11 : expression génique de cytokines inflammatoires par des myocytes traités par des fractions de différents milieux conditionnés de tissu adipeux humain

Des myocytes de la lignée C2C12 ont été traités 48h par des fractions de MC ou de VH de tissu adipeux humain issus de trois patients (P1, P2, P3) puis l'expression génique d'IL-6 (A) et MCP1 (B) a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en fois d'augmentation par rapport à un contrôle interne correspondant à des C2C12 non traitées.

Patiente	Sélection	pH des fractions sélectionnées
P1	a	• 5,8 • 6,3
	b	• 8,8 • 9,6
P2	c	• 6,1 • 6,4
	d	• 8,1 • 8,4 • 9,1
P3	e	• 5,8 • 6,3 • 6,3
	f	• 8,1 • 8,6
VH	g	• 5,9 • 6,1 • 6,4
	h	• 8,0 • 8,6 • 9,0

Tableau 4 : fractions de milieux conditionnés de tissu adipeux humain sélectionnées pour leur activité biologique

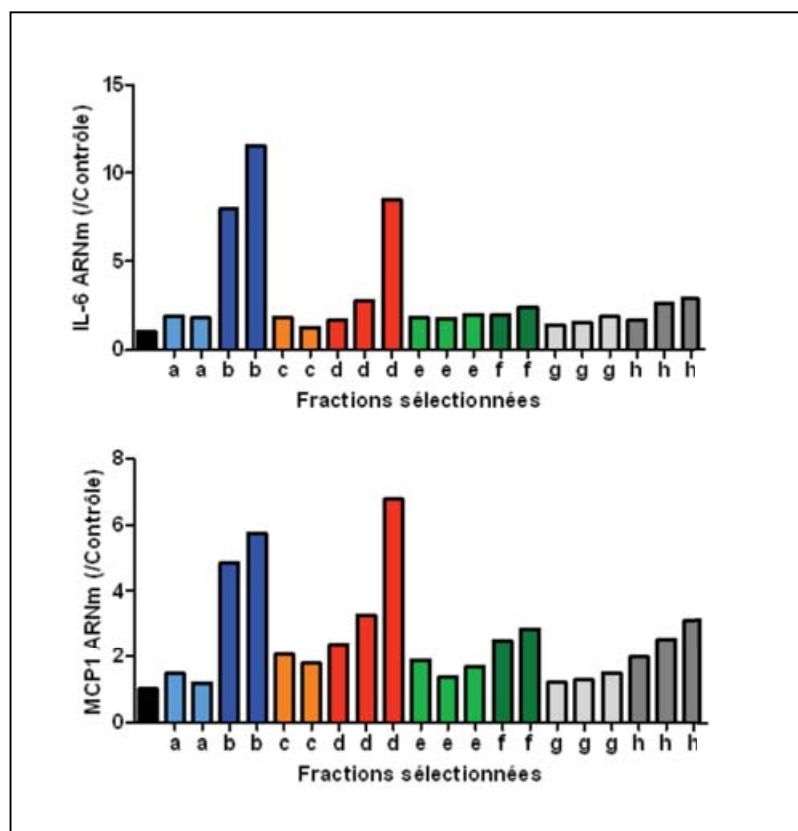


Figure 12 : comparaison de l'induction de l'expression génique de cytokines inflammatoires par les différentes fractions sélectionnées

Des C2C12 ont été traitées durant 48h par les fractions de pH ≈ 6 (a, c, e) et de pH ≈ 9 (b, d, f) puis l'expression d'IL-6 et MCP1 a été mesurée par RT-qPCR.

V. Discussion

Ce travail préliminaire a nécessité de nombreuses étapes de mise au point concernant dans un premier temps la recherche d'une réponse biologique aux MC suffisamment puissante pour être ensuite utilisée comme critère de criblage des « sous-sécrétomes » obtenus par fractionnement des MC. Dans un second temps nous avons consacré nos efforts à la maîtrise de la technique de fractionnement par isoélectrophocalisation elle-même.

Les premiers résultats acquis mettent en évidence différents effets des sécrétions du tissu adipeux, sur la stimulation de l'incorporation de glucose par l'insuline et sur le statut inflammatoire des cellules cibles. L'altération du métabolisme glucidique dans les adipocytes traités par les MC, suggère qu'un phénomène d'insulinorésistance partielle existe dans ce modèle. Cependant, nous n'avons pas étudié ici la voie de signalisation de l'insuline qui est généralement inhibée dans les cellules traitées par le sécrétome adipocytaire [195, 196].

Une des principales difficultés rencontrées dans notre étude est le choix d'une réponse biologique facilement détectable et reproductible permettant de sélectionner un « sous-sécrétome » contenant les facteurs d'intérêt. La diminution de l'incorporation de glucose en réponse à l'insuline dans les cellules traitées par les MC, n'est que de 32%. Cet effet faible nous a conduits à étudier l'effet des MC sur l'expression génique des cytokines inflammatoires. Les MC permettent de doubler l'expression de ces cytokines dans les adipocytes et de multiplier jusqu'à 8 fois leur expression dans les myocytes. Ces réponses de forte amplitude nous ont conduits à privilégier le modèle d'expression des cytokines inflammatoires dans les myocytes C2C12 traités par des MC de tissu adipeux humain dans la poursuite de notre étude. Cependant le niveau d'induction des cytokines inflammatoires est variable selon les MC utilisés. Cette variabilité entre les MC issus de patients différents (variabilité interindividuelle) peut être considérée comme un atout dans la stratégie d'identification des facteurs. Cela peut permettre de discriminer les facteurs présents de façon différentielle dans les milieux actifs et non actifs, afin de réduire le nombre de « facteurs candidats ».

VI. Perspectives de la seconde partie

Les expériences préliminaires montrent que les MC peuvent modifier le fonctionnement cellulaire, tant sur les adipocytes que sur les myocytes. De plus, nous avons montré sur les myocytes que ces effets pourraient être induits par un « sous-sécrétome ». Les travaux à venir devront déterminer les facteurs présents dans les fractions, responsables de ces effets.

L'analyse des facteurs contenus dans ces fractions pourra se faire par une analyse « protéomique ». Nous avons déjà mis en place une collaboration avec les plateformes de protéomique de Ranguel et Purpan, visant à identifier d'éventuels facteurs protéiques. Pour cela nous travaillons sur une approche de protéomique « soustractive » qui consiste à comparer la composition de fractions actives et inactives pour un pH donné. Nous avons purifié les premières fractions par une électrophorèse en gel monodimensionnel et ils ont été analysés. Les échantillons protéiques ont subi une digestion trypsique permettant la génération de peptides qui ont été injectés dans une puce de chromatographie liquide (chip C18 de 150 mm sur une nano-LC Agilent) puis analysés par un spectromètre de masse à trappe d'ions (Amazon ETD) et comparés à une banque de peptides théoriques (Banque IPI human), eux mêmes digérés par la trypsine. La liste de peptides obtenue ne permet pas d'établir de conclusion définitive concernant une protéine présente dans les fractions actives *versus* inactives. Il sera nécessaire répéter ces expériences afin d'obtenir un plus grand nombre de fractions actives et inactives issues de patients différents.

L'approche de protéomique utilisée dans l'ensemble de notre étude ne tient pas compte des facteurs lipidiques sécrétés par le tissu adipeux, les lipokines. Or, les données présentes dans la littérature suggèrent qu'elles jouent un rôle synergique avec les adipokines dans l'induction de l'inflammation [201]. Des expériences que nous avons menées parallèlement à notre étude montrent que lorsque les MC de tissu adipeux sont préparés dans du DMEM contenant 1% d'albumine leurs effets sur les cellules cibles sont considérablement modifiés (voir Poster en annexe). L'augmentation de l'expression des cytokines inflammatoires est très supérieure à celle constatée dans les cellules mises en présence de MC préparés sans albumine. De plus ces milieux préparés avec de l'albumine modifient le métabolisme glucidique à l'état basal sans altérer la signalisation de l'insuline. L'ajout de l'albumine au DMEM permet la sécrétion par le tissu adipeux de facteurs hydrophobes, et donc des lipides dans le MC. Cela suggère un rôle synergique ou potentialisateur des lipokines sur les effets des adipokines. Dans notre étude nous n'avons pas utilisé l'albumine pour la préparation des MC car sa forte concentration dans les milieux aurait rendu impossibles les étapes de fractionnement par isoélectrofocalisation et l'analyse « protéomique ». Il sera intéressant d'extraire la fraction lipidique de MC afin de mieux comprendre le rôle joué par les lipokines, et de mettre en place une approche de lipidomique permettant d'identifier les facteurs d'intérêt.

Conclusion générale

Ce travail de thèse illustre les rôles importants joués par les sécrétions du tissu adipeux, qu'il s'agisse de médiateurs lipidiques, ici le LPA, ou d'adipokines, présentes dans les MC. Les fonctions cellulaires et physiologiques influencées par le sécrétome adipocytaire sont diverses. Nous avons ainsi mis en évidence d'une part un exemple d'autorégulation de la masse adipeuse par l'ATX, et d'autre part une perturbation du métabolisme glucidique ainsi qu'une action proinflammatoire exercée par les MC. Ces résultats reflètent en grande partie les mécanismes mis en jeu lors du développement de l'obésité : développement de la masse grasse, inflammation chronique de bas niveau, maladies métaboliques.

La connaissance exhaustive des facteurs sécrétés par le tissu adipeux, de l'ensemble de leurs fonctions ainsi que des mécanismes cellulaires mis en jeu permettra de déterminer les acteurs représentant les meilleures perspectives d'innovations thérapeutiques dans les domaines de l'obésité et des pathologies qui y sont associées.

Annexes

I. Poster

Dusaulcy R, Grès S, Wanecq E, Valet P, Saulnier-Blache JS.

Adipose tissue secretes factors that regulate glucose metabolism and inflammation in adipocytes and myocytes.

Obesity reviews 2010 vol 11 (Supp 1) T1:PO.95 11th International Congress on Obesity, 2010, Stockholm, Sweden.

Adipose tissue secretes factors that regulate glucose metabolism and inflammation in adipocytes and myocytes

Dusaulcy, R¹, Grès, S¹, Wanecq, E¹, Valet, P¹, Saulnier-Blache, JS¹.

¹Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, INSERM U858, Toulouse, France.

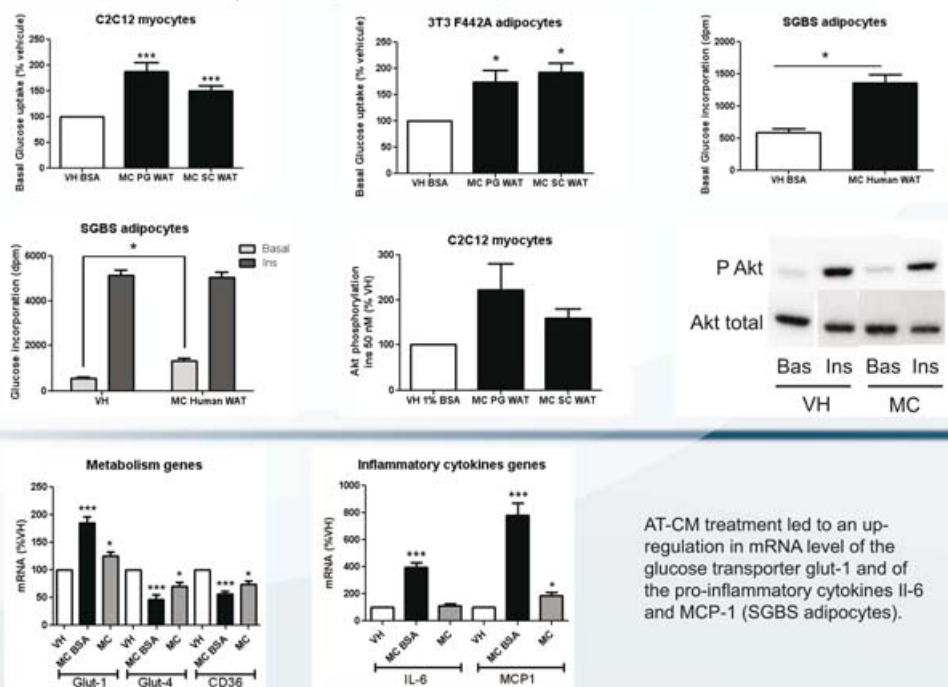
rodolphe.dusaulcy@inserm.fr

Introduction : Beside its lipid storage capacity, adipose tissue (AT) also exhibit an intense secretory activity. The objective of the present study is to identify AT secreted factors able to exert autocrine and/or paracrine influence on glucose metabolism and inflammation.

Methods: Serum free culture medium supplemented with albumin (BSA) were conditioned for 4 h with human or mouse AT. Adipose tissue-conditioned media (AT-CM) were used to treat cultured adipocytes (3T3F442A, SGBS) or myocytes (C2C12) for 48h.

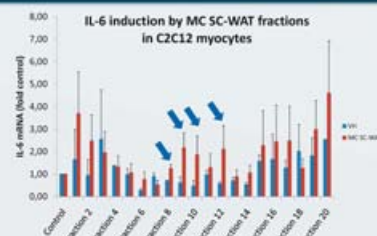
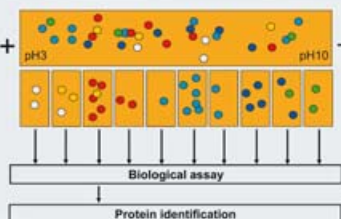
Whatever the origin of AT, treatment with AT-CM increased the basal glucose transport in both adipocytes and myocytes. No changes in insulin-stimulation of glucose transport and AKT phosphorylation were observed.

VH=Vehicle; WAT=White Adipose Tissue; PG= PeriGonadic ; SC=SubCutaneous

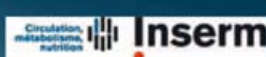


AT-CM treatment led to an up-regulation in mRNA level of the glucose transporter glut-1 and of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and MCP-1 (SGBS adipocytes).

Fractionations of AT-CM by isoelectrofocalization combined with lipidomic and proteomic analysis are currently performed to identify the proteins and/or lipids responsible for the bioactivity of AT-CM on adipocytes and myocytes.



Conclusions: These results suggest that AT secretes hydrophobic bioactive factors (lipids and/or proteins) that alter both the basal glucose metabolism and the pro-inflammatory status in adipocytes and myocytes without impacting insulin-signaling pathway.



II. Curriculum Vitae

- **Formation**

2008 – 2011 : Doctorat en Innovation Pharmacologique

Université de Toulouse – Université Paul Sabatier Toulouse III

2010 : UPAL (diplôme Utilisation et Protection de l'Animal de Laboratoire)

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

2008 : Master 2 Recherche en Innovation Pharmacologique

Université de Toulouse – Université Paul Sabatier Toulouse III

2006 : Licence de Biologie cellulaires et Physiologie

Université de Toulouse – Université Paul Sabatier Toulouse III

- **Expérience professionnelle**

Thèse : Les sécrétions du tissu adipeux : rôles de l'autotaxine et recherche de nouvelles adipokines

Equipe Sécrétions adipocytaires, obésités, et pathologies associées

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1048

Directeur de thèse : Dr Jean Sébastien Saulnier-Blache

Stage de Master 2 Recherche : Effet des sécrétions du tissu adipeux sur la réponse à l'insuline des cellules musculaires

Equipe Sécrétions adipocytaires, obésités, et pathologies associées

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1048

Maitre de stage : Dr Jean Sébastien Saulnier-Blache

Stage de Master 1 : Effet de l'apeline sur le transport de glucose par le tissu adipeux entier

Equipe Sécrétions adipocytaires, obésités, et pathologies associées

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1048

Maitre de stage : Pr Isabelle Castan-Laurell

- **Bourses**

2011 : Bourse de voyage de la Société Francophone du Diabète (SFD)

Congrès de la SFD 2011, Genève

2010 : Bourse de voyage de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité

11^{ème} Congrès International sur l'Obésité (ICO), Stockholm

2008 : Allocation de recherche du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche

- **Manuscrits originaux**

Dusaulcy R, Rancoule C, Grès S, Wanecq E, Colom A, Guigné C, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Valet P, Saulnier-Blache JS.

Adipose-specific disruption of Autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma Lysophosphatidic acid.

J Lipid Res. 2011 Jun;52(6):1247-55.

Attané C, Daviaud D, Dray C, Dusaulcy R, Masseboeuf M, Prévot D, Carpenne C, Castan-Laurell I, Valet P.

Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo.

J Mol Endocrinol. 2010 Nov 9.

Dusaulcy R, Daviaud D, Pradère JP, Grès S, Valet P, Saulnier-Blache JS.

Altered food consumption in mice lacking lysophosphatidic acid receptor-1.

J Physiol Biochem. 2009 Dec;65(4):345-50.

- **Résumés acceptés pour présentation de poster**

Dusaulcy R, Grès S, Wanecq S, Rancoule C, Colom A, Guigné C, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Valet P, Saulnier-Blache JS.

L'invalidation de l'autotaxine adipocytaire exacerbe l'obésité nutritionnelle et réduit l'acide lysophosphatidique plasmatique.

Congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD) 2011, Genève

Dusaulcy R, Grès S, Wanecq E, Valet P, Saulnier-Blache JS.

Adipose tissue secretes factors that regulate glucose metabolism and inflammation in adipocytes and myocytes.

Obesity reviews 2010 vol 11 (Supp 1) T1:PO.95 11th International Congress on Obesity, 2010, Stockholm, Sweden.

Dusaulcy R, Wanecq E, Colom A, Grès S, Guigné C, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Valet P, Saulnier-Blache JS.

Adipocyte-specific invalidation of autotaxin exacerbates high fat diet-induced obesity.

Obesity reviews 2010 vol 11 (Supp 1) T1:PO.17 11th International Congress on Obesity, 2010, Stockholm, Sweden.

Dray C, Attané C, Daviaud D, Knauf C, Dusaulcy R, Guigné C, Burcelin R, Valet P and Castan-Laurell I

L'apeline, une nouvelle adipokine activant l'AMPK dans le muscle squelettique et le tissu adipeux

25^{ème} Congrès annuel de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité, 2008, Paris

- **Présentations orales**

Dusaulcy R, Grès S, Wanecq E, Valet P, Saulnier-Blache JS.

Influence de facteurs sécrétés par le tissu adipeux sur le métabolisme glucidique et le statut pro-inflammatoire des adipocytes et des myocytes

27^{ème} Congrès annuel de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité, 2010, Paris

Dusaulcy R, Daviaud D, Pradère J-P, Grès S, Valet P and Saulnier-Blache JS.

Altered food consumption in mice lacking lysophosphatidic acid receptor-1.

6^{ème} congrès de la Communauté de Travail des Pyrénées, 2009, Huesca

- **Enseignement**

2008 – 2011 : Monitorat en Physiologie animale

Université de Toulouse – Université Paul Sabatier Toulouse III

- TD première année de licence : l'axe hypothalamo-hypophysaire
- TP première année de licence : régulation du stockage du glycogène hépatique, perméabilité de l'épithélium de la vessie chez la grenouille
- TP deuxième année de licence : absorption intestinale du glucose, automatisme et contraction cardiaque
- TP troisième année de licence : lipolyse

Références

1. Trayhurn, P., C.A. Drevon, and J. Eckel, *Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk*. Arch Physiol Biochem, 2011. **117**(2): p. 47-56.
2. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
3. Deng, Y. and P.E. Scherer, *Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1212**: p. E1-E19.
4. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1785-8.
5. Cao, H., et al., *Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism*. Cell, 2008. **134**(6): p. 933-44.
6. Valet, P., et al., *Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1431-8.
7. Fain, J.N., et al., *Regulation of leptin release and lipolysis by PGE2 in rat adipose tissue*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. **62**(4): p. 343-50.
8. Annuzzi, G., et al., *Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients*. Lipids Health Dis, 2010. **9**: p. 43.
9. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **316**(2): p. 129-39.
10. Guri, A.J. and J. Bassaganya-Riera, *Systemic effects of white adipose tissue dysregulation and obesity-related inflammation*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(4): p. 689-700.
11. Arai, Y., et al., *Adipokines and aging*. J Atheroscler Thromb, 2011. **18**(7): p. 545-50.
12. Penicaud, L., *The neural feedback loop between the brain and adipose tissues*. Endocr Dev, 2010. **19**: p. 84-92.
13. Boucher, J., et al., *Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity*. Endocrinology, 2005. **146**(4): p. 1764-71.
14. Sorhede Winzell, M., C. Magnusson, and B. Ahren, *The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice*. Regul Pept, 2005. **131**(1-3): p. 12-7.
15. Roth, J.D., et al., *Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: evidence from nonclinical and clinical studies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(20): p. 7257-62.
16. Wang, M.Y., et al., *Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(11): p. 4813-9.
17. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
18. Mohamed-Ali, V., et al., *Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4196-200.
19. Pardo, M., et al., *Peripheral leptin and ghrelin receptors are regulated in a tissue-specific manner in activity-based anorexia*. Peptides, 2010. **31**(10): p. 1912-9.

20. Caesar, R., et al., *A combined transcriptomics and lipidomics analysis of subcutaneous, epididymal and mesenteric adipose tissue reveals marked functional differences*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11525.
21. Tokumura, A., et al., *Positive and negative controls by protein kinases of sodium-dependent Ca²⁺ efflux from cultured bovine adrenal chromaffin cells stimulated by lysophosphatidic acid*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1389**(1): p. 67-75.
22. Aoki, J., A. Inoue, and S. Okudaira, *Two pathways for lysophosphatidic acid production*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 513-8.
23. Okudaira, S., H. Yukiura, and J. Aoki, *Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin*. Biochimie, 2010. **92**(6): p. 698-706.
24. Liliom, K., et al., *Growth factor-like phospholipids generated after corneal injury*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 1): p. C1065-74.
25. Stapleton, C.M., et al., *Lysophosphatidic acid activates peroxisome proliferator activated receptor-gamma in CHO cells that over-express glycerol 3-phosphate acyltransferase-1*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18932.
26. Fourcade, O., et al., *Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells*. Cell, 1995. **80**(6): p. 919-27.
27. Sonoda, H., et al., *A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34254-63.
28. Hiramatsu, T., et al., *Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 49438-47.
29. Aoki, J., *Mechanisms of lysophosphatidic acid production*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(5): p. 477-89.
30. Kazantseva, A., et al., *Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene LIPH*. Science, 2006. **314**(5801): p. 982-5.
31. Bektas, M., et al., *A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells*. J Cell Biol, 2005. **169**(5): p. 801-11.
32. Albers, H.M., et al., *Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(16): p. 7257-62.
33. Tomsig, J.L., et al., *Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo*. Biochem J, 2009. **419**(3): p. 611-8.
34. Tigyi, G. and A.L. Parrill, *Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(6): p. 498-526.
35. Brindley, D.N. and C. Pilquil, *Lipid phosphate phosphatases and signaling*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S225-30.
36. Samadi, N., et al., *Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance*. Biochimie, 2011. **93**(1): p. 61-70.
37. Berdichevets, I.N., et al., *Lysophosphatidic acid is a lipid mediator with wide range of biological activities. Biosynthetic pathways and mechanism of action*. Biochemistry (Mosc), 2010. **75**(9): p. 1088-97.
38. Goetzl, E.J., et al., *Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14573-8.
39. Osborn, T.M., et al., *Modifications of cellular responses to lysophosphatidic acid and platelet-activating factor by plasma gelsolin*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(4): p. C1323-30.

40. McIntyre, T.M., et al., *Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 131-6.
41. Choi, J.W., et al., *LPA receptors: subtypes and biological actions*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 157-86.
42. Murakami, M., et al., *Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(4): p. 707-12.
43. Pasternack, S.M., et al., *G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth*. Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 329-34.
44. Shimomura, Y., et al., *Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair*. Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 335-9.
45. Tabata, K., et al., *The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(3): p. 861-6.
46. Contos, J.J., et al., *Requirement for the lpa1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13384-9.
47. Simon, M.F., et al., *Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 14656-62.
48. Shano, S., et al., *Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1*. Neurochem Int, 2008. **52**(1-2): p. 216-20.
49. Inoue, M., et al., *Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling*. Nat Med, 2004. **10**(7): p. 712-8.
50. Pradere, J.P., et al., *LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(12): p. 3110-8.
51. Tager, A.M., et al., *The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak*. Nat Med, 2008. **14**(1): p. 45-54.
52. Contos, J.J., et al., *Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2)*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(19): p. 6921-9.
53. Kingsbury, M.A., et al., *Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding*. Nat Neurosci, 2003. **6**(12): p. 1292-9.
54. Ye, X., et al., *LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing*. Nature, 2005. **435**(7038): p. 104-8.
55. Sumida, H., et al., *LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis*. Blood, 2010. **116**(23): p. 5060-70.
56. van Meeteren, L.A., et al., *Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(13): p. 5015-22.
57. Tanaka, M., et al., *Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25822-30.
58. Liu, Y.B., et al., *LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4*. J Cell Biochem, 2010. **109**(4): p. 794-800.
59. Lee, Z., et al., *Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5435-45.
60. Nakanaga, K., K. Hama, and J. Aoki, *Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions*. J Biochem, 2010. **148**(1): p. 13-24.

61. Giganti, A., et al., *Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7776-89.
62. Narita, M., et al., *Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I alpha) from rat brain*. J Biol Chem, 1994. **269**(45): p. 28235-42.
63. Deissler, H., F. Lottspeich, and M.F. Rajewsky, *Affinity purification and cDNA cloning of rat neural differentiation and tumor cell surface antigen gp130RB13-6 reveals relationship to human and murine PC-1*. J Biol Chem, 1995. **270**(17): p. 9849-55.
64. Buckley, M.F., et al., *Plasma cell membrane glycoprotein PC-1. cDNA cloning of the human molecule, amino acid sequence, and chromosomal location*. J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17506-11.
65. Funakoshi, I., et al., *Molecular cloning of cDNAs for human fibroblast nucleotide pyrophosphatase*. Arch Biochem Biophys, 1992. **295**(1): p. 180-7.
66. Nishimasu, H., et al., *Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(2): p. 205-12.
67. Hausmann, J., et al., *Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(2): p. 198-204.
68. Kanda, H., et al., *Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 415-23.
69. Pamuklar, Z., et al., *Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis*. J Biol Chem, 2009. **284**(11): p. 7385-94.
70. Jansen, S., et al., *Domain interplay mediated by an essential disulfide linkage is critical for the activity and secretion of the metastasis-promoting enzyme autotaxin*. J Biol Chem, 2009. **284**(21): p. 14296-302.
71. Stefan, C., S. Jansen, and M. Bollen, *NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(10): p. 542-50.
72. Lee, J., et al., *Enzymatic activation of autotaxin by divalent cations without EF-hand loop region involvement*. Biochem Pharmacol, 2001. **62**(2): p. 219-24.
73. Bello, V., et al., *Characterization of a di-leucine-based signal in the cytoplasmic tail of the nucleotide-pyrophosphatase NPP1 that mediates basolateral targeting but not endocytosis*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(10): p. 3004-15.
74. Pradere, J.P., et al., *Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(1): p. 93-102.
75. Jansen, S., et al., *Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 14): p. 3081-9.
76. Jansen, S., et al., *An essential oligomannosidic glycan chain in the catalytic domain of autotaxin, a secreted lysophospholipase-D*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11084-91.
77. Tokumura, A., et al., *Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma*. Biochim Biophys Acta, 1986. **875**(1): p. 31-8.
78. Stracke, M.L., et al., *Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein*. J Biol Chem, 1992. **267**(4): p. 2524-9.
79. Murata, J., et al., *cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30479-84.

80. Umezu-Goto, M., et al., *Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production*. J Cell Biol, 2002. **158**(2): p. 227-33.
81. Tokumura, A., et al., *Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39436-42.
82. Zalatan, J.G., et al., *Structural and functional comparisons of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase: implications for mechanism and evolution*. Biochemistry, 2006. **45**(32): p. 9788-803.
83. Morishige, J., et al., *Production of bioactive lysophosphatidic acid by lysophospholipase D in hen egg white*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(4): p. 491-9.
84. Tsuda, S., et al., *Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26081-8.
85. Clair, T., et al., *Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate*. Cancer Res, 2003. **63**(17): p. 5446-53.
86. Dennis, J., et al., *Phosphodiesterase-Ialpha/autotaxin's MORFO domain regulates oligodendroglial process network formation and focal adhesion organization*. Mol Cell Neurosci, 2008. **37**(2): p. 412-24.
87. Yuelling, L.M. and B. Fuss, *Autotaxin (ATX): a multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matrix properties*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 525-30.
88. Kim, S.H., J. Turnbull, and S. Guimond, *Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor*. J Endocrinol, 2011. **209**(2): p. 139-51.
89. Hoeglund, A.B., et al., *Optimization of a pipemidic acid autotaxin inhibitor*. J Med Chem, 2010. **53**(3): p. 1056-66.
90. Zhang, H., et al., *Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo*. Cancer Res, 2009. **69**(13): p. 5441-9.
91. Saunders, L.P., et al., *Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(10): p. 3352-62.
92. Ferry, G., et al., *S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **327**(3): p. 809-19.
93. Jiang, G., D. Madan, and G.D. Prestwich, *Aromatic phosphonates inhibit the lysophospholipase D activity of autotaxin*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(17): p. 5098-101.
94. Albers, H.M., et al., *Discovery and optimization of boronic acid based inhibitors of autotaxin*. J Med Chem, 2011. **53**(13): p. 4958-67.
95. Gierse, J., et al., *A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **334**(1): p. 310-7.
96. Jiang, G., et al., *Alpha-substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA*. ChemMedChem, 2007. **2**(5): p. 679-90.
97. Ohta, H., et al., *Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(4): p. 994-1005.

98. Noguchi, K., et al., *Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(1): p. 15-23.
99. Boucharaba, A., et al., *The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(25): p. 9643-8.
100. Woclawek-Potocka, I., et al., *Lysophosphatidic acid modulates prostaglandin secretion in the bovine uterus*. Reproduction, 2009. **137**(1): p. 95-105.
101. Ma, L., et al., *Evidence for lysophosphatidic acid 1 receptor signaling in the early phase of neuropathic pain mechanisms in experiments using Ki-16425, a lysophosphatidic acid 1 receptor antagonist*. J Neurochem, 2009. **109**(2): p. 603-10.
102. Okusa, M.D., et al., *Selective blockade of lysophosphatidic acid LPA3 receptors reduces murine renal ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(3): p. F565-74.
103. Swaney, J.S., et al., *A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(7): p. 1699-713.
104. Swaney, J.S., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic acid type 1 receptor-selective antagonist*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **336**(3): p. 693-700.
105. Castellino, F.V., et al., *Amelioration of dermal fibrosis by genetic deletion or pharmacologic antagonism of lysophosphatidic acid receptor 1 in a mouse model of scleroderma*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(5): p. 1405-15.
106. Tigyi, G., *Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets*. Br J Pharmacol, 2010. **161**(2): p. 241-70.
107. Ishihara, R., et al., *Attenuation by cyclic phosphatidic acid of peritoneal metastasis of azoxymethane-induced intestinal cancers in Wistar rats*. Int J Cancer, 2004. **110**(2): p. 188-93.
108. Baker, D.L., et al., *Carba analogs of cyclic phosphatidic acid are selective inhibitors of autotaxin and cancer cell invasion and metastasis*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22786-93.
109. Uchiyama, A., et al., *Inhibition of transcellular tumor cell migration and metastasis by novel carba-derivatives of cyclic phosphatidic acid*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(1): p. 103-12.
110. Saulnier-Blache, J.S., *[Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(8-9): p. 799-803.
111. Smyth, S.S., et al., *Roles of lysophosphatidic acid in cardiovascular physiology and disease*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 563-70.
112. Subramanian, P., et al., *Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation*. Circ Res, 2010. **107**(1): p. 96-105.
113. Hu, Y.L., et al., *Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(10): p. 762-8.
114. So, J., et al., *Lysophosphatidic acid enhances epithelial ovarian carcinoma invasion through the increased expression of interleukin-8*. Gynecol Oncol, 2004. **95**(2): p. 314-22.
115. Rivera-Lopez, C.M., A.L. Tucker, and K.R. Lynch, *Lysophosphatidic acid (LPA) and angiogenesis*. Angiogenesis, 2008. **11**(3): p. 301-10.
116. Zhou, Z., et al., *Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium*. Cell Metab, 2011. **13**(5): p. 592-600.
117. Fan, H., et al., *Lysophosphatidic acid inhibits bacterial endotoxin-induced pro-inflammatory response: potential anti-inflammatory signaling pathways*. Mol Med, 2008. **14**(7-8): p. 422-8.

118. Murch, O., M. Collin, and C. Thiemermann, *Lysophosphatidic acid reduces the organ injury caused by endotoxemia-a role for G-protein-coupled receptors and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Shock, 2007. **27**(1): p. 48-54.
119. Kehlen, A., et al., *IL-1 beta- and IL-4-induced down-regulation of autotaxin mRNA and PC-1 in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis (RA)*. Clin Exp Immunol, 2001. **123**(1): p. 147-54.
120. Zhao, C., et al., *TNF-alpha promotes LPA1- and LPA3-mediated recruitment of leukocytes in vivo through CXCR2 ligand chemokines*. J Lipid Res, 2011. **52**(7): p. 1307-18.
121. Goetzl, E.J., Y. Kong, and J.K. Voice, *Cutting edge: differential constitutive expression of functional receptors for lysophosphatidic acid by human blood lymphocytes*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 4996-9.
122. Merchant, T.E., et al., *Phospholipid profiles of human colon cancer using 31P magnetic resonance spectroscopy*. Int J Colorectal Dis, 1991. **6**(2): p. 121-6.
123. Westermann, A.M., et al., *Malignant effusions contain lysophosphatidic acid (LPA)-like activity*. Ann Oncol, 1998. **9**(4): p. 437-42.
124. Masuda, A., et al., *Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma*. Br J Haematol, 2008. **143**(1): p. 60-70.
125. Liu, S., et al., *Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases*. Cancer Cell, 2009. **15**(6): p. 539-50.
126. David, M., et al., *Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9741.
127. Guo, R., et al., *Expression and function of lysophosphatidic acid LPA1 receptor in prostate cancer cells*. Endocrinology, 2006. **147**(10): p. 4883-92.
128. Glatt, S., et al., *hGPR87 contributes to viability of human tumor cells*. Int J Cancer, 2008. **122**(9): p. 2008-16.
129. Zhang, Y., et al., *The G protein-coupled receptor 87 is necessary for p53-dependent cell survival in response to genotoxic stress*. Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6049-56.
130. Hama, K., et al., *Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17634-9.
131. Fang, X., et al., *Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 257-64.
132. Nam, S.W., et al., *Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6938-44.
133. Samadi, N., et al., *Lysophosphatidate induces chemo-resistance by releasing breast cancer cells from taxol-induced mitotic arrest*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20608.
134. Deng, W., et al., *Lysophosphatidic acid protects and rescues intestinal epithelial cells from radiation- and chemotherapy-induced apoptosis*. Gastroenterology, 2002. **123**(1): p. 206-16.
135. Deng, W., et al., *The lysophosphatidic acid type 2 receptor is required for protection against radiation-induced intestinal injury*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 1834-51.
136. Fukushima, N., *LPA in neural cell development*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 993-1003.
137. Ye, X., et al., *Lysophosphatidic acid in neural signaling*. Neuroreport, 2002. **13**(17): p. 2169-75.

138. Ma, L., et al., *Evidence for de novo synthesis of lysophosphatidic acid in the spinal cord through phospholipase A2 and autotaxin in nerve injury-induced neuropathic pain*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **333**(2): p. 540-6.
139. Inoue, M., et al., *Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid*. Neuroscience, 2008. **152**(2): p. 296-8.
140. Inoue, M., et al., *Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain*. Mol Pain, 2008. **4**: p. 6.
141. Castilla-Ortega, E., et al., *Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA1 receptor*. Neurobiol Learn Mem, 2010. **94**(1): p. 73-82.
142. Rancoule, C., et al., *Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2011. **20**(5): p. 657-67.
143. Pradere, J.P., et al., *Lysophosphatidic acid and renal fibrosis*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 582-7.
144. Xue, J., et al., *Effects of lysophosphatidic acid and its receptors LPA(1/3) on radiation pneumonitis*. Oncol Rep, 2010. **24**(6): p. 1515-20.
145. Gan, L., et al., *Blockade of lysophosphatidic acid receptors LPAR1/3 ameliorates lung fibrosis induced by irradiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **409**(1): p. 7-13.
146. Hayashi, K., et al., *Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids*. Circ Res, 2001. **89**(3): p. 251-8.
147. Komachi, M., et al., *Signaling pathways involved in DNA synthesis and migration in response to lysophosphatidic acid and low-density lipoprotein in coronary artery smooth muscle cells*. Vascu Pharmacol, 2009. **50**(5-6): p. 178-84.
148. Zhang, C., et al., *Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation*. J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 763-74.
149. Panchatcharam, M., et al., *Lysophosphatidic acid receptors 1 and 2 play roles in regulation of vascular injury responses but not blood pressure*. Circ Res, 2008. **103**(6): p. 662-70.
150. Watanabe, N., et al., *Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C*. J Clin Gastroenterol, 2007. **41**(6): p. 616-23.
151. Watanabe, N., et al., *Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity*. Life Sci, 2007. **81**(12): p. 1009-15.
152. Tangkijvanich, P., et al., *Platelet-derived growth factor-BB and lysophosphatidic acid distinctly regulate hepatic myofibroblast migration through focal adhesion kinase*. Exp Cell Res, 2002. **281**(1): p. 140-7.
153. Ikeda, H., et al., *Effects of lysophosphatidic acid on proliferation of stellate cells and hepatocytes in culture*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(2): p. 436-40.
154. Ikeda, H., et al., *Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(5): p. G880-6.
155. Tokumura, A., et al., *Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity*. Life Sci, 2007. **80**(18): p. 1641-9.
156. Tokumura, A., *Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 18-25.
157. Saulnier-Blache, J.S., et al., *A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification*. J Lipid Res, 2000. **41**(12): p. 1947-51.

158. van Meeteren, L.A., et al., *Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21155-61.
159. Ferguson, C.G., et al., *Fluorogenic phospholipid substrate to detect lysophospholipase D/autotaxin activity*. Org Lett, 2006. **8**(10): p. 2023-6.
160. Gesta, S., et al., *Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis*. J Lipid Res, 2002. **43**(6): p. 904-10.
161. Pages, C., et al., *Endothelial differentiation gene-2 receptor is involved in lysophosphatidic acid-dependent control of 3T3F442A preadipocyte proliferation and spreading*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 11599-605.
162. Ferry, G., et al., *Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18162-9.
163. Ahn, J.I., et al., *Temporal expression changes during differentiation of neural stem cells derived from mouse embryonic stem cell*. J Cell Biochem, 2004. **93**(3): p. 563-78.
164. Boucher, J., et al., *Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression*. Diabetologia, 2005. **48**(3): p. 569-77.
165. Yea, K., et al., *Lysophosphatidic acid regulates blood glucose by stimulating myotube and adipocyte glucose uptake*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(2): p. 211-20.
166. Pradere, J.P., *Etude de la régulation et du rôle de l'autotaxine et de l'acide lysophosphatidique dans le tissu adipeux et le rein*. 2007, Université Paul Sabatier: Toulouse.
167. Guilherme, A., K. Torres, and M.P. Czech, *Cross-talk between insulin receptor and integrin alpha5 beta1 signaling pathways*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 22899-903.
168. Lin, Y.T., et al., *Inhibition of adipogenesis by RGD-dependent disintegrin*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(10): p. 1469-78.
169. Herrera, B.M., S. Keildson, and C.M. Lindgren, *Genetics and epigenetics of obesity*. Maturitas, 2011. **69**(1): p. 41-9.
170. Holness, M.J. and M.C. Sugden, *Epigenetic regulation of metabolism in children born small for gestational age*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. **9**(4): p. 482-8.
171. Jagannathan, R., et al., *AT1 receptor induced alterations in histone H2A reveal novel insights into GPCR control of chromatin remodeling*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12552.
172. Thomas, A.P., et al., *Inflammatory phenotyping identifies CD11d as a gene markedly induced in white adipose tissue in obese rodents and women*. J Nutr, 2011. **141**(6): p. 1172-80.
173. Lewis, J.D., et al., *Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study*. Diabetes Care, 2011. **34**(4): p. 916-22.
174. Holcomb, I.N., et al., *FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family*. EMBO J, 2000. **19**(15): p. 4046-55.
175. Dray, C., et al., *Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice*. Cell Metab, 2008. **8**(5): p. 437-45.
176. Attane, C., et al., *Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo*. J Mol Endocrinol, 2011. **46**(1): p. 21-8.
177. Ramanjaneya, M., et al., *Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity*. Endocrinology, 2010. **151**(7): p. 3169-80.

178. Maeda, K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(2): p. 286-9.
179. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10697-703.
180. Steppan, C.M., et al., *The hormone resistin links obesity to diabetes*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 307-12.
181. Yang, R.Z., et al., *Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(6): p. E1253-61.
182. Yang, Q., et al., *Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes*. Nature, 2005. **436**(7049): p. 356-62.
183. Sjöholm, K., et al., *The expression of inhibin beta B is high in human adipocytes, reduced by weight loss, and correlates to factors implicated in metabolic disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(4): p. 1308-14.
184. Mutch, D.M., et al., *Using gene expression to predict the secretome of differentiating human preadipocytes*. Int J Obes (Lond), 2009. **33**(3): p. 354-63.
185. Magnusson, B., et al., *Activin B inhibits lipolysis in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **395**(3): p. 373-6.
186. Kratchmarova, I., et al., *A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(3): p. 213-22.
187. Zvonick, S., et al., *Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(1): p. 18-28.
188. Zhong, J., et al., *Temporal profiling of the secretome during adipogenesis in humans*. J Proteome Res, 2010. **9**(10): p. 5228-38.
189. Wang, P., et al., *Profiling of the secreted proteins during 3T3-L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(18): p. 2405-17.
190. Alvarez-Llamas, G., et al., *Characterization of the human visceral adipose tissue secretome*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(4): p. 589-600.
191. Lim, J.M., et al., *Defining the regulated secreted proteome of rodent adipocytes upon the induction of insulin resistance*. J Proteome Res, 2008. **7**(3): p. 1251-63.
192. Clement, S., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by adipose tissue induces direct lipid accumulation in hepatocytes*. Hepatology, 2008. **48**(3): p. 799-807.
193. Zhou, L., et al., *Conditioned medium obtained from in vitro differentiated adipocytes and resistin induce insulin resistance in human hepatocytes*. FEBS Lett, 2007. **581**(22): p. 4303-8.
194. Nov, O., et al., *Interleukin-1beta may mediate insulin resistance in liver-derived cells in response to adipocyte inflammation*. Endocrinology, 2010. **151**(9): p. 4247-56.
195. Dietze, D., et al., *Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes*. Diabetes, 2002. **51**(8): p. 2369-76.
196. Dietze-Schroeder, D., et al., *Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2003-11.
197. Seyoum, B., A. Fite, and A.B. Abou-Samra, *Effects of 3T3 adipocytes on interleukin-6 expression and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **410**(1): p. 13-8.

198. Eckardt, K., et al., *Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle*. Diabetologia, 2009. **52**(4): p. 664-74.
199. Skurk, T., C. Alberti-Huber, and H. Hauner, *Effect of conditioned media from mature human adipocytes on insulin-stimulated Akt/PKB phosphorylation in human skeletal muscle cells: role of BMI and fat cell size*. Horm Metab Res, 2009. **41**(3): p. 190-6.
200. Wabitsch, M., et al., *Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2001. **25**(1): p. 8-15.
201. Lamers, D., et al., *Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(5): p. 1177-88.

Abstract

In addition to its storage function, adipose tissue is now considered an endocrine organ whose secretions can act locally in an autocrine and paracrine manner, and / or on distant cells in many organs. The secretome of adipose tissue consists of lipid factors, the lipokines, and protein factors, the adipokines. These factors have various functions in the body including energy metabolism, inflammation, or cell proliferation and angiogenesis.

The first part of the manuscript deals with a lipid mediator, lysophosphatidic acid (LPA), and autotaxin (ATX), a secreted lysophospholipase D responsible for its synthesis. The expression of ATX is increased in adipose tissue of obese and insulin resistant individuals. The aim of this study was to clarify the role of adipocyte ATX in obesity *in vivo* and its impact on plasma levels of LPA. For this, we invalidated the ATX coding gene specifically in adipocytes, using a Cre / lox transgenic approach in mice. The invalidation of adipocyte ATX resulted in 38% reduction of plasma LPA compared with wild-type mice. When these mice are fed an obesogenic high fat diet their mass of adipose tissue increases to a greater extent when compared to wild-type mice. This phenotype is associated with an increased expression of nuclear receptor PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ) and some of its target genes (ap2, adiponectin, leptin, Glut-1), as well as with an improved glucose tolerance of the mice. These results show that adipocyte ATX contributes significantly to plasma levels of LPA and that it behaves as a negative regulator of adipose tissue expansion in response to a high fat diet.

The second part of the manuscript focuses on finding new adipokines involved in disturbances of glucose metabolism and inflammation. We have demonstrated an increased expression of the inflammatory cytokines IL-6 and MCP1 in the C2C12 myocytes cell line when they are exposed to adipose tissue conditioned media (MC). Ongoing experiments aim to identify the factors responsible for these effects by fractioning the bioactivity of MC using isoelectric focusing followed by mass spectrometry.

This work illustrates the important roles played by the secretion of adipose tissue. We have shown an example of self-regulation of body fat mass by autotaxin, and proposed an approach to identify new biologically active factors.

Résumé

Parallèlement à sa fonction de stockage, le tissu adipeux est aujourd'hui considéré comme un organe endocrine dont les sécrétions peuvent agir localement, de façon autocrine et paracrine, et/ou à distance sur de nombreux organes. Le sécrétome du tissu adipeux est composé de facteurs lipidiques, les lipokines, et protéiques, les adipokines. Ces facteurs ont des fonctions diverses dans l'organisme notamment sur le métabolisme énergétique, l'inflammation, ou encore la prolifération cellulaire et l'angiogénèse.

La première partie du manuscrit porte sur un médiateur lipidique, l'acide lysophosphatidique (LPA), et l'autotaxine (ATX), une lysophospholipase D sécrétée responsable de sa synthèse. L'expression de l'ATX est augmentée dans le tissu adipeux de sujets obèses et insulino-résistants. Le but de cette étude était de préciser le rôle *in vivo* de l'ATX adipocytaire au cours de l'obésité et ses conséquences sur les taux plasmatiques de LPA. Pour cela nous avons invalidé le gène codant pour l'ATX spécifiquement dans l'adipocyte chez des souris, à l'aide d'une approche transgénique de type Cre/lox. L'invalidation de l'ATX adipocytaire a entraîné une diminution de 38% du LPA plasmatique comparativement à des souris sauvages. Lorsque ces souris sont soumises à un régime obésogène enrichi en graisses, la masse de leur tissu adipeux augmente de façon plus importante comparativement aux souris sauvages. Ce phénotype est associé à une augmentation de l'expression du récepteur nucléaire PPAR γ et de certains de ses gènes cibles (ap2, adiponectine, leptine, Glut-1), ainsi qu'à une augmentation de la tolérance au glucose des souris. Ces résultats montrent que l'ATX adipocytaire contribue fortement aux taux plasmatiques de LPA et qu'elle constitue un frein à l'expansion du tissu adipeux en réponse à un régime gras.

La deuxième partie du manuscrit porte sur la recherche de nouvelles adipokines impliquées dans des perturbations du métabolisme glucidique et dans l'inflammation. Nous avons mis en évidence une augmentation d'expression des cytokines inflammatoires IL-6 et MCP1 par des myocytes de la lignée C2C12 traités par des milieux conditionnés (MC) d'explants de tissu adipeux. Nous tentons d'identifier le ou les facteurs responsables de ces effets par une approche de fractionnement de l'activité biologique des MC par isoélectrofocalisation, suivie d'une analyse en spectrométrie de masse.

Ce travail illustre les rôles importants joués par les sécrétions du tissu adipeux. Nous avons ainsi mis en évidence un exemple d'autorégulation de la masse adipeuse par l'ATX, et proposé une démarche permettant l'identification de nouveaux facteurs biologiquement actifs.